



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie – Agronomie – Santé (VAS)**

présentée par

**Damien Baudiffier**

Préparée au sein de l'unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*  
(ECOT) INERIS, Verneuil – en – Halatte  
Et avec la collaboration du Laboratoire de Physiologie et génomique des  
poissons, (LPGP) INRA, Rennes

---

**Modes de  
perturbation de la  
stéroïdogénèse  
testiculaire et de la  
spermatogénèse chez  
le poisson zèbre  
(*Danio rerio*) par des  
fongicides azolés**

**Thèse soutenue à l'INERIS  
le 19/10/2012**

devant le jury composé de :

**Paule VASSEUR**

Professeur - Université de Metz/ *rapporteur*

**Magalie BAUDRIMONT**

Professeur - université de Bordeaux 1 / *rapporteur*

**Christophe MINIER**

Professeur – Université du Havre/ *examineur*

**Rüdiger SCHULZ**

Professeur - université d'Utrecht/ *examineur*

**Farzad PAKDEL**

DR + Université de Rennes/ *examineur*

**Alexis FOSTIER**

DR + INRA de Rennes/ *directeur de thèse*

**François BRION**

Ingénieur de recherche + INERIS/ *co-directeur de thèse*

## **Remerciements**

*Je tiens tout d'abord à remercier Magalie Baudrimont et Paule Vasseur d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie vivement le professeur Rüdiger Schulz d'avoir répondu présent pour participer au jury de cette thèse et pour ses nombreux conseils scientifiques. Merci également à Christophe Minier et Farzad Pakdel d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Alexis Fostier, mon directeur de thèse, pour m'avoir suivi, malgré la distance, et pour ses conseils, en particulier au moment de la rédaction du manuscrit. Travailler avec vous aura été très enrichissant. Merci pour votre enthousiasme et votre disponibilité.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement François Brion pour son encadrement. Tout d'abord, merci pour l'enthousiasme et l'énergie consacrée depuis mon master 2 jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Nos nombreuses discussions ainsi que tes conseils avisés m'ont permis de mener à bien ce projet. Merci aussi pour m'avoir motivé et encouragé dans les moments difficiles. Je tiens également à remercier vivement Nathalie Hinfrey pour ses conseils scientifiques et son aide précieuse en histologie.*

*Je voudrais remercier Eric Thybaud et Jean-Marc Porcher pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions au sein de l'unité d'écotoxicologie in vivo et in vitro de l'INERIS.*

*J'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'équipe ECOT. Un merci à mes deux colocataires de bureaux, Saby, basketteuse et clubeuse tout terrain, et Nico, qui aurait également pu faire carrière dans la chanson (même s'il semble quand même bien parti pour une carrière scientifique). Un grand merci à maître Vincent, mon colocataire de bureau de cette dernière année de thèse, pour sa bonne humeur et sa sincérité.*

*Je remercie également ma colocatrice de biologie moléculaire, Nadia, pour sa bonne humeur. J'en profite pour saluer l'ensemble de l'équipe Toxi, en particulier les thésards Marc et Samir. Un merci particulier à Catherine, qui a dû me supporter (et inversement) en temps qu'encadrant intermittent. Merci à toi pour ta bonne humeur et ton tempérament !*

*Je remercie chaleureusement celles qui ont été mes guides de laboratoires et dont la bonne humeur est contagieuse, Manu, Mélanie Vosges, Anne et Audrey. Merci également à Olivier Palluel et Cyril pour leur aide technique et leurs talents culinaires ou d'imitateur. Un grand merci à Benjamin pour son professionnalisme et sa connaissance du poisson zèbre. Je remercie également Sandrine, qui a toujours su sélectionner des stagiaires au top, et également Patrick, Edith, Wilfried et Anne. Enfin, un merci tout particulier à Sélim Aït Aïssa pour ses conseils sur et en dehors du terrain. Un grand merci à tous les stagiaires et thésards passés par le laboratoire. Merci à Awa, Romy, Melissa, Kelly, coureuse des bois malgré elle, Nora, Aude, Amelle, Damien R., Olivier C. Merci aussi à ceux que j'aurai pu oublier !*

*J'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'équipe EVEC, avec un merci tout particulier à Alice, pour son enthousiasme, sa sincérité et sans qui j'aurai fait beaucoup moins de sport. Je remercie également Vanessa, notre maman, qui rend toujours les choses plus simples. Un vif merci à Nicolas M. et Nicolas C. pour nos nombreuses discussions artistico-mondaines.*

*Un immense merci à mes compagnons de voyage, sans qui ces quelques années passées en Picardie n'auraient pas eu la même saveur. Pour commencer, merci à ceux qui ont contribué à faire d'Aumont-en-Halatte un lieu atypique. A Yann et Matthieu, musicien et philosophe, à Ginie et Laetitia baroudeuses hors pairs, à Emilie et Perrine, intrépide et téméraire, je vous remercie ! A Melanie V., toujours à l'écoute et entière, un grand merci, heureusement que tu étais là ! A Julien, un grand merci pour ta motivation et ton état d'esprit. Merci de m'avoir parfois remotivé sur cette fin de thèse. A Raph (R<sup>TM</sup>), généreux dans l'action et élément moteur, merci pour tous les bons moments passés ensemble. Un grand merci à Benoit et Pierre, les forces tranquilles, chacun à leur manière, sans qui la vie à Creil aurait été plus terne. Merci également à Etienne, guitariste à ses heures perdues, fervent défenseur de la scène underground des années 90, et merci à Marion, infatigable petite elfe des bois. Merci à Julien C., pour son sarcasme permanent, et également à Loïc, Julien S., JB, JC, Nicolas B. et Maxime. Merci enfin aux derniers venus, Elodie, François et Olivier S. !*

*J'adresse aussi un petit clin d'œil à toute l'équipe du Palace et aux doctorants bretons, avec de Rennes à Lannion : Marianne, Thomas, Kenny et Yohan ! Merci aussi à Renaud, Anne-Laure, Mat et Vinc pour leur soutien au cours de ces années de thèse ! Merci également à Ted R et autres ogres et ogresses !*

*Pour terminer j'adresse mes plus profonds remerciements à ma famille. A mes parents et à mon frère, pour leur soutien sans faille. A mes grands parents, qui m'ont toujours soutenu, vous m'avez permis de prendre du recul et je vous en remercie.*

## Liste des publications et des communications

### Publications :

**Baudiffier D.**, Hinfray N., Ravaud C., Creusot N., Chadili E., Porcher JM., Schulz R., Brion F. Effect of *in vivo* chronic exposure to clotrimazole on zebrafish testis function, *en preparation*.

Hinfray N., Nobrega RH.; Caulier M., **Baudiffier D.**, Maillot-Maréchal E., Chadili E., Palluel O., Porcher JM., Schulz R., Brion F. Cyp17 and Cyp19a1 enzymes localization in the adult zebrafish (*Danio rerio*) testis is differentially affected by estradiol, *en preparation* (**Annexe 2**)

**Baudiffier D.**; Hinfray N.; Vosges M.; Creusot N.; Chadili E.; Porcher JM.; Schulz RW.; Brion F., 2012. A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish. *Toxicology*, 298 (1-3): 30-39.

Hinfray N., **Baudiffier D.**, Leal MC., Porcher JM., Aït-Aïssa S., Le Gac F., Schulz R., Brion F, 2011. Characterization of testicular expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. *General and Comparative Endocrinology*, 174 (3): 309-317.

### Communications affichées:

**Baudiffier D.**, Hinfray N., Vosges M., Porcher JM., Schulz RW., Brion F. Characterization of the mode of action of the pharmaceutical clotrimazole on testicular steroidogenesis in zebrafish – SETAC Europe, 6ème congrès mondial, 20-24 mai 2012, Berlin, Allemagne. (**Annexe 1**)

**Baudiffier D.**, Hinfray N., Porcher JM., Schulz R., Brion F. Caractérisation du mode d'action et des effets d'une substance pharmaceutique, le clotrimazole, sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le poisson zèbre. *Colloque ANTIOPE*, 19-20 mars 2012, Avignon, France.

**Baudiffier D.**, Hinfray N., Porcher JM., Brion F. Effect of azole fungicides on testicular steroidogenesis *in vivo* and *ex vivo* in zebrafish (*Danio rerio*). *SETAC Europe*, 21ème colloque annuel, 15-19 mai 2011, Milan, Italie.

**Baudiffier D.**, Hinfray N., Porcher J.M., Le Gac F., Schulz RW., Brion F. Effect of several azole fungicides on biosynthesis of androgen using an *ex vivo* zebrafish testis explants culture, *PRIMO*, 16ème colloque, 15-18 mai 2011, Long Beach, Etats- Unis.

**Baudiffier D.**, Hinfray N., Porcher JM., Aït-Aïssa S., Le Gac F., Schulz RW., Brion F. Clotrimazole affects differently the zebrafish (*Danio rerio*) testicular steroidogenesis *in vivo* and *ex vivo*. 10ème colloque de la fondation IPSEN, 30 décembre 2010, Paris, France.



## Résumé

Les azoles sont des fongicides présents dans les milieux aquatiques et connus pour inhiber des activités enzymatiques de cytochromes P450 (CYP), incluant plusieurs CYP impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse gonadique chez les vertébrés. En revanche, il n'y a que très peu d'information sur le potentiel perturbateur endocrinien de ces molécules chez le poisson *in vivo*. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de caractériser le mécanisme d'action d'un fongicide pharmaceutique, le clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le poisson zèbre au travers l'étude d'un réseau de gènes fonctionnels le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade. Il s'agit également d'évaluer la capacité du clotrimazole à perturber la spermatogénèse.

Nous montrons que le clotrimazole est capable d'affecter la stéroïdogénèse de manière différente *in vitro* et *in vivo* (i) l'exposition d'explants testiculaires *in vitro* inhibe la synthèse de 11-kétotestostérone (11-KT), montrant une action directe de la molécule sur le testicule et (ii) l'exposition *in vivo* provoque une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse. Une approche plus poussée des niveaux d'expression de gènes au niveau de l'axe hypophyse-gonade nous a permis de mettre en évidence un système de compensation biologique au niveau de l'organisme, avec un rôle prépondérant de la voie Fsh/FshR dans la médiation des effets du clotrimazole sur le testicule. Enfin, des effets sur la spermatogénèse ont été observés *in vivo* suite à une exposition chronique au clotrimazole, avec une augmentation de la masse gonadique et du nombre de cellules de Leydig, accompagnée d'une élévation des niveaux de 11-KT circulante. Les effets tissulaires observés sont cohérents avec des effets mesurés au niveau moléculaire, comme par exemple les effets observés sur des marqueurs de cellules germinales ou somatiques.

L'ensemble de ces données montre l'intérêt de la démarche expérimentale utilisée, combinant (i) des approches *in vitro* et *in vivo*, mais également (ii) l'étude d'un réseau de gènes réalisée en parallèle d'analyses au niveau tissulaire, pour caractériser le mécanisme d'action du clotrimazole. Une telle approche pourrait être étendue à d'autres composés agissant comme des inhibiteurs de CYP. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives, en premier lieu sur l'étude de l'impact fonctionnel du clotrimazole sur la reproduction, en incluant des études mâles et femelles.

**Mots clefs :** azoles fongicides, perturbateurs endocriniens, stéroïdogénèse, spermatogénèse, poisson zèbre (*Danio rerio*), *in vivo* et *in vitro*.

## Abstract

Azole fungicides are detected in the aquatic environment and can inhibit enzymatic activities of cytochrome P450 (CYP), including several CYP involved in steroidogenesis in vertebrates. However, little information is available on the endocrine disrupting potency of these chemicals in fish *in vivo*. In this context, this thesis aims to characterize the mechanism of action of the pharmaceutical clotrimazole on testicular steroidogenesis in zebrafish using a network of functional genes along the brain-pituitary-gonad axis and to evaluate the effect of clotrimazole on spermatogenesis.

We show that clotrimazole is able to affect steroidogenesis differently *in vitro* and *in vivo* (i) the exposure of testicular explants *in vitro* inhibits the synthesis of 11-ketotestosterone, showing a direct action on the testis, and (ii) *in vivo* exposure increases the transcript levels of genes involved in steroidogenesis. An integrative approach of gene expression measurements along the pituitary-gonad axis highlights a mechanism of biological compensation, with a critical role of the Fsh/FshR pathway in mediating the effects of clotrimazole on testicular steroidogenesis. Finally, effects on spermatogenesis were observed *in vivo* following chronic exposure to clotrimazole, with an increase in GSI as well as in number of Leydig cells. Elevated levels of circulating 11-KT were also observed. These observations are consistent with measurements at molecular level, since we observed an over-expression of cell-specific markers, i.e. *piwill* and *igf3*.

Taken together, these data show the interest of an integrative approach, combining (i) *in vitro* and *in vivo* experiments, and (ii) the study of a functional gene network performed in parallel with tissue analysis in order to characterize the mechanism of action of clotrimazole. This approach could be extended to other compounds acting as inhibitors of CYP. This work raises further concerns, primarily on the study of the functional impact of clotrimazole on reproduction, including male and female studies.

Keywords: azole fungicides, endocrine disruptors, steroidogenesis, spermatogenesis, zebrafish (*Danio rerio*), *in vivo* and *in vitro*.

## Abréviations

**3 $\beta$ -HSD** : 3 $\beta$ - hydroxystéroïde deshydrogénase

**11 $\beta$ -HSD** : 11 $\beta$ -hydroxystéroïdes deshydrogénase

**11-KT** : 11-kétotestostérone

**17 $\beta$ -HSD** : 17 $\beta$ -hydroxystéroïdes deshydrogénase

**AChE** : acétylcholinestérase

**A<sub>diff</sub>** = spermatogonies différenciées de type A

**A<sub>und</sub>** : spermatogonies indifférenciées de type A

**AhR** : *aryl hydrocarbon receptor* (récepteur des hydrocarbures aromatiques)

**Amh** : *anti- mullerian hormone* (hormone anti- mullerienne)

**AMPc** : adénosine 3'5' monophosphate cyclique

**AR** : *androgen receptor* (récepteur des androgènes)

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**CAR** : *constitutive androstanes receptor* ou récepteurs des androstanes

**CYP** : cytochrome P450

**Cyp11c1** : cytochrome P450 11- $\beta$ -hydroxylase

**Cyp17a1** : cytochrome P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase / 17, 20-lyase)

**Cyp19** : cytochrome P450 aromatase

**CYP51** : cytochrome P450 14 $\alpha$ -déméthylase

**DHEA** : déhydroépiandrostérone

**DHP** : 17 $\alpha$ ,20  $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one

**Dmrt1** : *doublesex and mab-3 related transcription factor 1*

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**DPH** : day post hatch

**E<sub>2</sub>** : 17 $\beta$ -œstradiol

**EE<sub>2</sub>** : 17 $\alpha$ -éthynyl-œstradiol

**ELISA** : *enzyme-linked immunosorbent assay*

**eSR34** : *eel spermatogenesis related substance 34*

**FgB** : fibrogène B

**FgC** : fibrogène C

**FI** : facteur d'induction

**Foxl2** : *forkhead box L2*

**FSDT** : *Fish Sexual Development Test*

**FSH** : *follicle-stimulating hormone* (hormone stimulant le follicule)

**FshR** : *follicle-stimulating hormone receptor*

**FSK** : forskoline

**GH** : *growth hormone* (hormone de croissance)

**GnRH** : *gonadotropin-releasing hormones* (gonadolibérine)

**Gnrh3** : *gonadotropin-releasing hormone 3*

**GSI** : *gonado-somatic index* (rapport gonado-somatique)

**HAP** : hydrocarbures aromatiques polycycliques

**HPG** : axis: *hypothalamo- pituitary- gonadal* axis (axe hypothalamus- hypophyse- gonade)

**HPLC** : Hight Performance Liquid Chromatography

**HSDs** : hydroxystéroïdes déshydrogénases

**IGF-1** : *insulin-like growth factor 1*

**Imposex** : imposition of male sex characteristics on female snails

**Jpf** : jours post-fécondation

**LbT2** : lignée cellulaire hypophysaire gonadotrope

**LH** : *luteinizing hormone* (hormone luteinisante)

**Log Kow** : coefficient de partition octanol-eau

**MAS** : *meiosis-activating sterols* (stéroïls activant la méiose)

**ND** : Non détecté

**LOD** : *limit of detection* (limite de détection)

**OCDE** : organisation de coopération et de développement économiques

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**OSPAR** : Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (OSPAR pour Oslo-Paris)

**P450 scc** : cytochrome P450 *side-chain clivage*, également appelée Cyp11a

**PBDE** : polybromodiphényléther

**PBS** : tampon phosphate

**PCB** : polychlorobiphényles

**PE** : perturbateur endocrinien

**Piwi1** : *piwi-like 1* ou *ziwi*

**PR** : *progesterone receptor* ou récepteur de la progestérone

**PXR** : *pregnane-X receptor*

**Q-PCR** : quantitative polymerase chain reaction

**RT** : reverse transcription

**Sox9** : *SRY (sex determining region Y)-box 9*

**SPE** : *solid phase extraction* (extraction en phase solide)

**SSC** : *spermatogonial stem cell*

**StaR** : steroidogenic acute regulatory protein

**STEP** : station d'épuration des eaux usées

**SXR** : récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques

**T** : testostérone

**TBT** : tributylétain

**TCDD** : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

**Vtg** : vitellogénine

## Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	5
<b>I. Les perturbateurs endocriniens : généralité</b>	6
I.1. Définitions	6
I.2. Des mécanismes d'action variés	7
<i>I.2.1. Effets directs sur les récepteurs nucléaires :</i>	
<i>I.2.2. Effets non relayés par les récepteurs nucléaires</i>	
<b>II. Les azoles fongicides : des polluants émergents</b>	11
II.1. Définition et utilisation :	11
II.2. Mécanismes d'action des azoles antifongiques	12
II.3. Les fongicides azolés dans l'environnement aquatique	13
II.4. Effets biologiques des azoles	18
<b>III. La stéroïdogénèse</b>	20
III.1. Définition	20
III.2. Les acteurs moléculaires de la stéroïdogénèse testiculaire	21
III.3. La stéroïdogénèse cérébrale	22
<b>IV. La spermatogénèse chez les poissons</b>	23
IV.1. Généralité	23
IV.2. Structure du testicule	23
IV.3. Processus de la spermatogénèse chez les vertébrés	25
IV.4. Processus de la spermatogénèse chez les poissons	26
<b>V. Le contrôle de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse chez les poissons téléostéens</b>	
	28

V.1. Le rôle central de l'axe Hypothalamus-Hypophyse-Gonade :	28
V.2. Les hormones stéroïdiennes :	32
V.3. Les autres régulateurs de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse	33
<i>V.3.1. Facteurs protéiques</i>	
<i>V.3.2. Neurohormones et facteurs de croissance</i>	
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	36
<b>CHOIX BIOLOGIQUES ET DEMARCHE EXPERIMENTALE</b>	38
<b>I. Choix biologiques</b>	39
I.1. Modèle biologique : le poisson zèbre	39
I.2. Choix des molécules :	40
<i>I.2.1. Les fongicides azolés</i>	
<i>I.2.2. L'ethinyl œstradiol</i>	
<i>I.2.3. La forskoline</i>	
<b>II. Expositions</b>	44
II.1. Expositions <i>in vivo</i>	42
<i>II.1.1. Contrôle de l'exposition</i>	
<i>II.1.2. Prélèvement des échantillons biologiques</i>	
II.2. Expositions <i>in vitro</i>	46
<i>II.2.1. Méthode de mise en culture des explants testiculaires :</i>	
<i>II.2.2. Exposition et traitement des explants testiculaires</i>	
<b>III. Mesures des paramètres biologiques</b>	48
III.1. Mesure d'expression de gènes	48
<i>III.1.1. Choix des gènes cibles</i>	
<i>III.1.2. Méthode de quantification des gènes</i>	
<i>III.1.3. Expression des résultats « gènes »</i>	
III.2. Immunohistochimie et dosage de 11-kétotestostérone	53

*III.2.1. Immunohistochimie par fluorescence*

*III.2.2. Dosage de la 11-kétotestostérone*

III.3. Analyse morphométrique de la spermatogenèse 55

## **RESULTATS 57**

### **Chapitre I : Effets du clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le poisson zèbre adulte 59**

Contexte 59

Objectif et démarche expérimentale 59

Résultats principaux : 60

Résultats complémentaires 61

Conclusions 66

#### **Article 1 67**

### **Chapitre II : Effets du clotrimazole sur l'axe hypophyse-gonade chez le poisson zèbre adulte:l'induction de la stéroïdogénèse par le clotrimazole implique la voie Fsh/Fshr**

76

Contexte 76

Objectif et démarche expérimentale 76

Résultats principaux : 77

Résultats complémentaires 77

Conclusions 78

#### **Article 2 80**

### **Chapitre III : Effet d'une exposition de 21 jours au clotrimazole sur l'axe hypophyse-gonade et impact sur la spermatogenèse 95**

Contexte 95

Objectif et démarche expérimentale 95

Résultats principaux : 96



Résultats complémentaires	97
Conclusions	99
<i>Article 3</i>	101
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	118
<b>I. Les effets du clotrimazole et les mécanismes sous-jacents en jeu</b>	120
I.1. Les effets directs du clotrimazole	120
I.2. Les effets indirects du clotrimazole	121
<i>I.2.1. Mécanisme d'action</i>	
<i>I.2.2. Effets du clotrimazole sur la spermatogenèse</i>	
<i>I.2.3. Bilan</i>	
I.3. Limites de la démarche expérimentale	125
<b>II. Utilisation des connaissances pour une évaluation du risque</b>	128
II.1. Intérêts de l'étude dans une perspective d'évaluation des dangers et des risques des perturbateurs endocriniens dans un cadre réglementaire	128
II.2. Vers une approche intégrée et une modélisation des critères d'évaluation de la perturbation	131
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	134
<b>ANNEXE 1</b>	139
<b>ANNEXE 2</b>	141
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	167

# **Introduction générale**

Depuis une vingtaine d'années, la présence de perturbateurs endocriniens (PE) dans l'environnement a soulevé de nombreuses interrogations au sein de la communauté scientifique en raison des risques qu'ils représentent pour l'homme et les écosystèmes (Colborn and Clement 1992; Kavlock *et al.*, 1996). En effet, les PE peuvent causer des « effets néfastes sur la santé d'un organisme ou sa descendance, secondairement à des changements de la fonction endocrine » (OCDE, 1999) (Who 2002). Leurs mécanismes d'action sur le système endocrinien sont multiples puisqu'ils peuvent agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine, depuis la synthèse des hormones jusqu'à leur action au niveau des tissus cibles (Kavlock et al., 1996). Outre cette diversité d'actions, les PE regroupent une vaste catégorie de substances chimiques de natures et de structures très variées puisque sous ce terme sont regroupés aussi bien les hormones naturelles, les hormones de synthèse que des pesticides, des polychlorobiphényles (PCB) ou encore des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

L'environnement aquatique est le réceptacle ultime de ces produits chimiques naturels ou provenant de l'activité humaine (Sumpter 1998). Les organismes aquatiques sont par conséquent des cibles privilégiées des PE. Depuis ces 20 dernières années, des travaux ont été menés en laboratoire ou dans le milieu aquatique, révélant des effets de ces composés sur la physiologie de la reproduction des poissons (Vos *et al.*, 2000). Plusieurs études ont établi un lien entre la présence de PE dans l'environnement et des effets néfastes sur la fonction de reproduction chez certains organismes aquatiques (Tyler *et al.*, 1998) (Vos et al., 2000). Par exemple, chez des femelles gastéropodes exposées au tributylétain (TBT), un agent biocide utilisé dans les peintures anti-salissures, des cas d' 'imposex' (*imposition of male sex characteristics on female snails*) ont été observés (Bryan and Gibbs 1991). Chez les poissons, des perturbations de protéines hormono- régulées ainsi que des altérations histologiques dans les gonades mâles ont été mises en évidence et reliées à l'exposition à des composés œstrogènes mimétiques (Jobling *et al.*, 1998).

Dans ce contexte, il est nécessaire de mener des actions de recherche pour développer des outils permettant d'évaluer les dangers et les risques liés à l'exposition des organismes aquatiques à ces substances chimiques, et de détecter de manière précoce des effets liés aux PE. Jusqu'à présent, les travaux menés sur les PE se sont principalement focalisés sur les composés qui agissent comme agonistes des récepteurs des œstrogènes (ER). Ce sont principalement le 17β-œstradiol (E<sub>2</sub>), le 17α-éthynyl œstradiol (EE<sub>2</sub>), mais ces composés regroupent également les alkylphénols ou encore les bisphénols. Ces PE peuvent mimer

l'action de l'œstradiol naturel endogène et sont capables d'induire l'expression de gènes œstrogène- régulés. Par exemple, la vitellogénine (Vtg), qui est un précurseur des protéines du vitellus, produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes, puis acheminée par le sang vers les ovaires, est induite chez des mâles exposés à des composés œstrogéniques et constitue par conséquent un marqueur d'œstrogénicité d'une molécule (Sumpter and Jobling 1995; Tyler *et al.*, 1999; Brion *et al.*, 2002). Chez les organismes aquatiques, l'exposition aux œstrogènes mimétiques a aussi été associée à des effets néfastes sur la reproduction des individus et des populations (Jobling *et al.*, 2002; Nash *et al.*, 2004). Certains outils développés dans le cadre de ces recherches, dont le but est de détecter les œstrogènes mimétiques, ont été utilisés à des fins réglementaires. Ainsi, la présence de Vtg chez les poissons mâles est un paramètre pris en compte dans le cadre de lignes directrices mises en place par l'OCDE.

Cependant, les perturbateurs endocriniens peuvent agir via des modes d'action variés, ne passant pas par une interaction avec les récepteurs des œstrogènes. Dans ce cas, un critère de perturbation endocrinienne comme la détection de Vtg peut se révéler inadapté pour mettre en évidence une perturbation endocrinienne. De plus, la concentration en Vtg chez un poisson mâle ne permet pas de conclure sur sa santé physiologique, ni sur sa capacité de reproduction. Dans le cadre général de l'étude des effets des PE, il apparaît donc essentiel d'étudier d'autres mécanismes d'action en lien avec la fonction de reproduction. Dans ce contexte, l'étude de la stéroïdogenèse gonadique semble pertinente. En effet, ce processus est supporté par une cascade de réactions enzymatiques dont le but est de synthétiser des hormones stéroïdiennes actives comme les œstrogènes et les androgènes. Le processus de la stéroïdogenèse est régulé directement au niveau central par les gonadotropines hypophysaires Lh (« Luteinizing Hormone ») et Fsh (« Follicle Stimulating Hormone ») et de manière plus générale par l'axe Hypothalamus- Hypophyse- Gonade (HPG). La stéroïdogenèse joue un rôle dans la gamétogenèse (reproduction), le développement ou encore le comportement. Ce processus remplit donc des fonctions biologiques essentielles à la vie d'un organisme.

Il semble donc important de considérer les perturbations de la stéroïdogenèse. Parmi les enzymes intervenant dans ce processus de la stéroïdogenèse, l'aromatase, qui convertit l'androsténédione en œstrone et la testostérone en œstradiol, est une cible connue de plusieurs composés chimiques, qui vont moduler son activité. Par exemple, plusieurs fongicides azolés dont le mécanisme d'action primaire est l'inhibition des cytochromes P450, sont capables d'inhiber l'activité de l'aromatase, qui appartient à cette famille enzymatique, chez les

poissons (Vinggaard *et al.*, 2000; Hinfray *et al.*, 2006). Cependant, l'aromatase catalyse une étape parmi d'autres dans le processus de la stéroïdogénèse, qui est supportée par une série de réaction enzymatique.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets de PE sur la stéroïdogénèse testiculaire en s'appuyant sur un réseau de gènes fonctionnels dans la gonade mais également au niveau central. Les composés chimiques utilisés sont des fongicides pharmaceutiques azolés, en particulier le clotrimazole, qui a été sélectionné en partie pour sa capacité à inhiber *in vitro* et *in vivo* l'activité de certaines enzymes de la stéroïdogénèse. Le but de ce travail est donc d'améliorer les connaissances sur le mode d'action du clotrimazole et d'évaluer son impact sur la spermatogénèse. Dans le même temps, il s'agira de mettre en œuvre des outils dont on souhaite savoir si ce sont de bons indicateurs pour détecter des PE et pour « prédire » des effets sur la reproduction. Pour répondre à ces question, nous avons choisi d'utiliser comme modèle le poisson zèbre (*Danio rerio*), qui a une biologie connue et qui est fréquemment utilisé en toxicologie.

Le manuscrit s'organise de la manière suivante :

La première partie de ce manuscrit est consacrée à la synthèse bibliographique afin de poser les bases de ce travail de thèse. Dans un premier temps, la problématique des perturbateurs endocriniens a été abordée en décrivant de manière concise les différentes classes de perturbateurs endocriniens en fonction de leur mécanisme d'action. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux fongicides azolés. Les deux autres parties ont été consacrées à un état des lieux des connaissances sur la stéroïdogénèse et la spermatogénèse chez les poissons téléostéens, en s'intéressant également à leurs perturbations par des composés chimiques.

La seconde partie présente les objectifs précis de la thèse et la démarche expérimentale mise en œuvre pour y répondre. Cette partie permet d'introduire le chapitre « Résultats » qui s'articule autour de trois articles (deux acceptés et un en préparation). Chacun de ces articles a été associé à un résumé en français rappelant la démarche, les objectifs et les principaux résultats. Pour venir appuyer et enrichir les résultats principaux, des résultats complémentaires ont été présentés.

Enfin, une dernière partie a permis de discuter nos résultats et de les replacer dans le contexte plus général de la problématique des PE et de l'évaluation des risques.

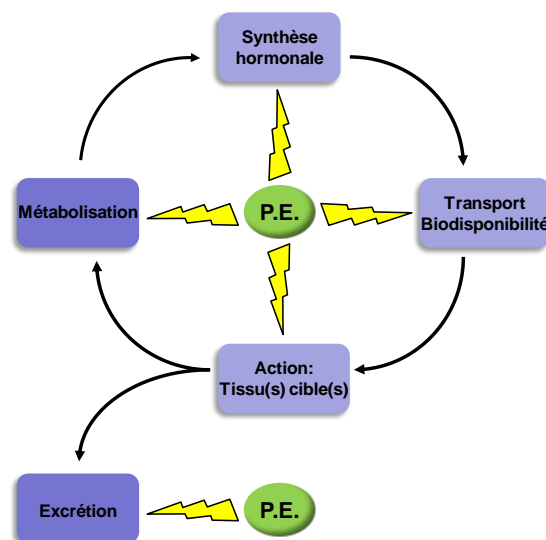
# **Synthèse bibliographique**

## I. Les perturbateurs endocriniens : généralité

### I.1. Définitions

Au cours de ces 40 dernières années, de nombreux exemples ont montré que des substances présentes dans l'environnement sont potentiellement capables de perturber la physiologie et l'endocrinologie des organismes (Bitman *et al.*, 1970; Colborn *et al.*, 1993). De plus, l'environnement aquatique constitue le réceptacle ultime de ces composés chimiques, et les organismes qui y vivent en sont des cibles privilégiées (Sumpter 1998; Tyler *et al.*, 1998; Hernando *et al.*, 2006).

Parmi ces composés, les « perturbateurs endocriniens » (PE) ont été définis de manière générale par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme des « substances ou mélanges exogènes altérant les fonctions du système endocrinien et induisant des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-) populations » (Who 2002). Ils ont également été définis en considérant leurs mécanismes multiples d'action sur le système endocrinien (**figure 1**) comme « des substances chimiques exogènes qui, interférant avec les fonctions du système hormonal, risquent d'influencer négativement les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action, et d'élimination (catabolisme, excrétion) des hormones, hormones responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du comportement » (Kavlock *et al.*, 1996).



**Figure 1** : Cibles des PE au sein du système endocrinien

A ce jour, l'activité de perturbation endocrine d'un nombre croissant de composés environnementaux a été démontrée ou suspectée (Commission européenne, 2007<sup>1</sup>). Ces PE sont structurellement et fonctionnellement très divers et ils appartiennent à différents groupes de composés chimiques d'origines naturelles ou anthropiques (Jobling et al., 1998; Hotchkiss et al., 2008) :

- Parmi les PE d'origine naturelle, on retrouve des hormones stéroïdiennes (œstradiol, progestérone, testostérone, etc ...), des phyto-hormones (génistéine, coumestrol, flavonoïdes, coumestrol, etc ...) ou des myco-hormones (zéaralénone et ses métabolites, etc ...) ;
- Les PE d'origine synthétique regroupent de nombreuses substances issues de l'activité humaine, comme des plastifiants (phtalates, bisphénol A, etc ...), des pesticides (méthoxychlore, atrazine, etc ...), des substances pharmaceutiques (ethinyl-oestradiol, diethylstilbestrol, etc ...), des cosmétiques (par exemple : filtres UV), des dioxines (par exemple : TCDD), des composés halogénés persistants (HAP, PCB, PBDE, etc ...), des détergents (par exemple : alkylphénols), ou encore des métaux lourds (cadmium, uranium, etc ...). Ces composés chimiques proviennent de différentes activités, industrielles, agricoles ou urbaines.

Parmi les molécules citées ci-dessus comme exemple, certaines sont des xéno-œstrogènes et vont pouvoir interagir avec les récepteurs des œstrogènes. Les effets de ces molécules sont parmi les plus décrits dans la littérature (Tyler and Routledge 1998). Cependant, les modes d'action des PE peuvent être multiples et ne se limitent pas aux xéno-œstrogènes.

## I.2. Des mécanismes d'action variés

Les PE peuvent moduler le système endocrinien par des mécanismes d'action variés et complexes, causant des effets néfastes sur plusieurs fonctions de l'organisme, comme par exemple la reproduction, l'immunité, ou encore le système nerveux. Ils peuvent en effet agir sur l'ensemble du système endocrinien, depuis la synthèse des hormones jusqu'à leur catabolisme, en passant par des actions au niveau des tissus cibles (**figure 1**). L'un des mécanismes les plus documenté est la capacité de certains PE à interagir avec les récepteurs nucléaires et à moduler les réponses géniques contrôlées par ces récepteurs.

<sup>1</sup>Commission européenne, 2007. Document de travail "Community Strategy for Endocrine Disrupters" - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.



### I.2.1. Effets directs sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont normalement activés par la fixation de leur(s) ligand(s) naturel(s) et ils agissent comme facteurs de transcription en se fixant sur leurs éléments de réponse au niveau des promoteurs afin de réguler l'expression de gènes cibles. Cependant, certains PE peuvent mimer les ligands naturels et venir se fixer aux niveaux des récepteurs nucléaires, perturbant ainsi les régulations transcriptionnelles contrôlées par ces récepteurs. Ils peuvent ainsi agir comme des agonistes ou des antagonistes. Parmi les mécanismes d'action impliquant des récepteurs nucléaires, les effets de PE interagissant avec les récepteurs hormonaux sont les plus étudiés : il s'agit principalement des récepteurs aux œstrogènes (ER) et dans une moindre mesure des récepteurs aux androgènes (AR) (Gray *et al.*, 2006) ou encore des récepteurs à la progestérone (PR). Il existe cependant d'autres types de récepteurs nucléaires, comme les récepteurs aux xénobiotiques (xénorécepteurs) : le récepteur à la dioxine (arylhydrocarbon, AhR) ; le pregnane X receptor (PXR) ; ou encore le récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques (SXR). Le **tableau 1** montre de manière non exhaustive quelques exemples de ligands, naturels ou synthétiques, des principaux récepteurs nucléaires.

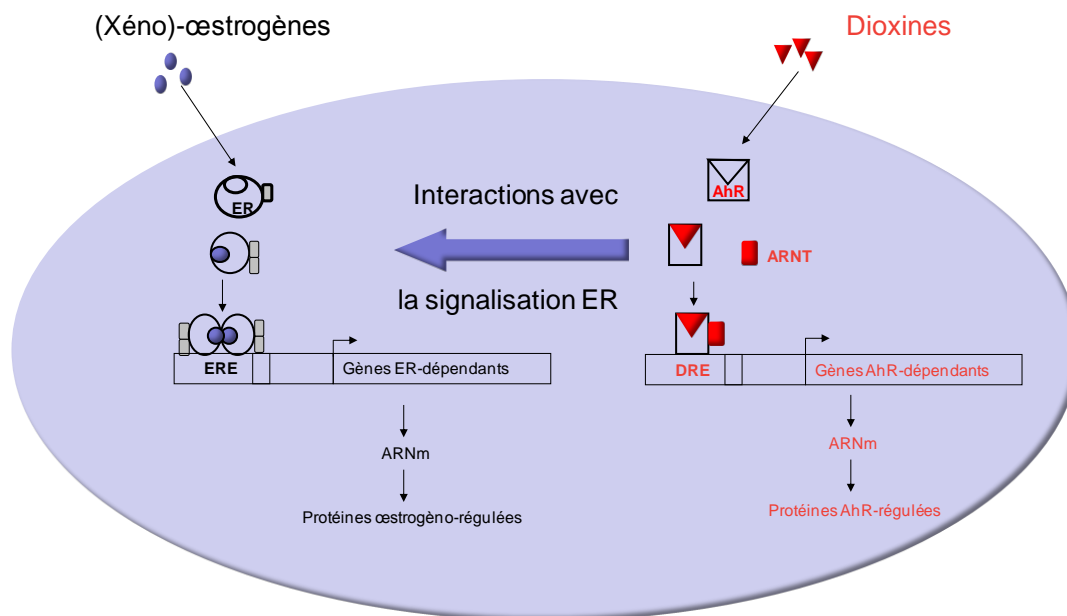
**Tableau 1** : exemples de ligands environnementaux des principaux récepteurs nucléaires chez l'homme et chez les poissons téléostéens

Types de récepteurs	Récepteurs	ligands	Références
stéroïdiens	ER	<i>Stéroïdes naturels (e.g. E1, E2)</i> Composés pharmaceutiques (e.g. EE2, DES) Produits cosmétiques (e.g. benzophénone 1, 2 et 3)	Escande <i>et al.</i> , 2006 Fent <i>et al.</i> , 2006 Molina-Molina <i>et al.</i> , 2008
	AR	<i>Stéroïdes naturels (e.g. testostérone, androsténédione)</i> Phytoœstrogène (e.g. 5-hydroxyflavone, génistéine) Plastifiants (e.g. BPA, benzyl-butylphthalates)	Térouanne <i>et al.</i> , 2000 Nishizaki <i>et al.</i> , 2009 Kruger <i>et al.</i> , 2008
	PR	<i>Stéroïdes naturels (progestérone)</i> Composés pharmaceutiques (e.g. gestrinone, trenbolone) Surfactants (e.g. nonylphénol)	Molina-Molina <i>et al.</i> , 2006 Death <i>et al.</i> , 2004 Viswanath <i>et al.</i> , 2008
xénobiotiques	AhR	Hydrocarbures aromatiques Halogénés (HAH) Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) Dioxines (e.g. TCDD, ligand de haute affinité)	Poland <i>et al.</i> , 1976 Van den Berg <i>et al.</i> , 2006 Berhens <i>et al.</i> , 2001
	PXR	Stéroïdes (e.g. androsténédione, testostérone) Pesticides (e.g. chlorpyrifos, méthoxychlor) Composés pharmaceutiques (e.g. kétoconazole)	Eckins <i>et al.</i> , 2008
autres	PPAR	e.g. Acides gras naturels ou synthétiques	Hostetler <i>et al.</i> , 2005
	TR	e.g. OH-PCB, DDT, pesticides organochlorés Retardateurs de flammes bromés (e.g. BPDE 209)	Cheek <i>et al.</i> , 1999 Hamers <i>et al.</i> , 2006 Weiss <i>et al.</i> , 2009

NB : en italique sont indiqués les ligands naturels des récepteurs nucléaires

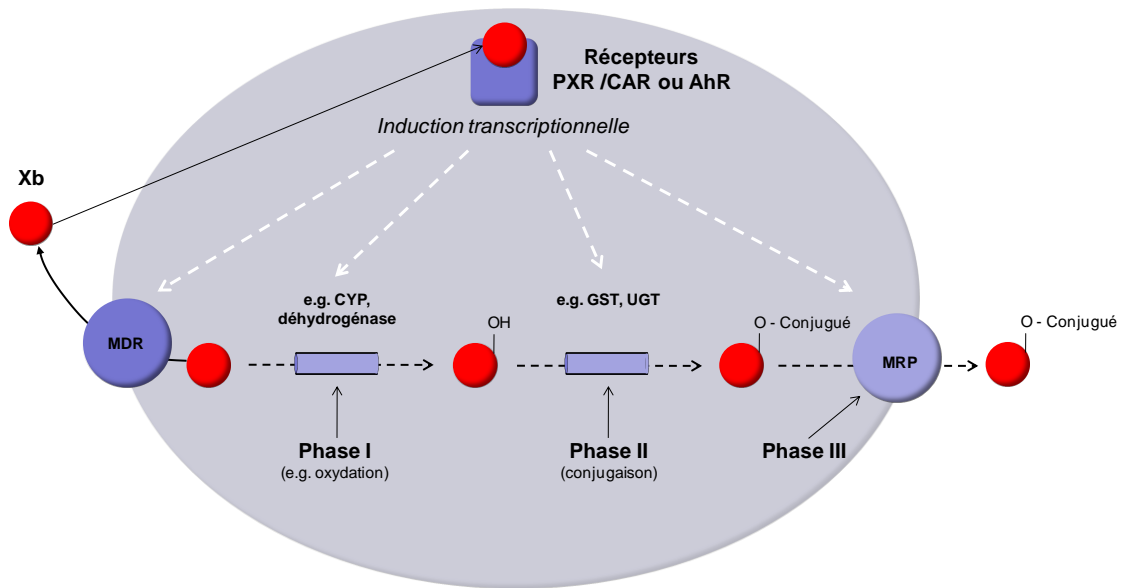
Afin d'illustrer la complexité des mécanismes d'interactions de PE avec des récepteurs nucléaires, l'exemple d'expositions à des xénoœstrogènes et à des dioxines (**figure 2**) est intéressant. Les xénoœstrogènes, comme l'EE<sub>2</sub>, se lient aux ER et induisent la transcription de gènes œstrogène- régulés, comme l'aromatase ou la vtg alors que la dioxine (par exemple la TCDD) est le ligand de référence du récepteur AhR. Plusieurs études ont rapporté l'existence de relation entre les voies ER et AhR suite à des co- expositions de composés homologues à des œstrogènes ou à la dioxine (Safe *et al.*, 1998; Ohtake *et al.*, 2003). Il a ainsi été démontré que la TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) pouvait avoir un effet anti- œstrogénique sur des modèles poissons *in vivo* et *in vitro* (Bemanian *et al.*, 2004; Cheshenko *et al.*, 2007), probablement du fait de l'interaction entre les AhR et les ER activés (Ohtake *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les ligands du récepteur AhR peuvent également agir par une voie non- génomique : l'activation de l'AhR provoque l'assemblage d'un complexe ubiquitine ligase dont il est une des composantes. Cela induit alors la dégradation du ER (Ohtake *et al.*, 2011).



**Figure 2** : interaction complexe de PE avec les récepteurs nucléaires ER et AhR (d'après Safe *et al.*, 1998 ; Ohtake *et al.*, 2003)

Enfin, une des réponses transcriptionnelle les plus importantes suite à l'interaction entre des PE et des récepteurs est l'induction de l'expression de gènes codant pour des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, assurée principalement par deux catégories d'enzymes : les *enzymes de phase I*, dites de fonctionnalisation, et les *enzymes de phase II*, dites de conjugaison (**figure 3**). L'expression des gènes codant pour ces enzymes de phase I ou de phase II est induite principalement suite à l'interaction entre les xénobiotiques et les récepteurs PXR et CAR, ou encore AhR (Gueguen *et al.*, 2006; Timsit and Negishi 2007; di Masi *et al.*, 2009; Ihunnah *et al.*, 2011).



**Figure 3** : métabolisme des xénobiotiques

CYP = Cytochrome P450, GST = Glutathion S-transférase, UGT = Glucoronyl Transférase

MDR = Multi- Drug Resistance, MRP = Multi-Resistance Protein

Ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques interviennent également dans le catabolisme hormonal, qui a essentiellement lieu dans le foie, mais également dans d'autres tissus, dont les gonades, comme démontré par exemple chez la morue de l'Atlantique (Husoy *et al.*, 1994).

Il existe également d'autres mécanismes ne passant pas par les récepteurs, qui sont à ce jour moins étudiés et tout aussi complexes.

### *1.2.2. Effets non relayés par les récepteurs nucléaires*

D'autres perturbateurs endocriniens ont des mécanismes d'action ne passant pas par les récepteurs nucléaires mais pouvant interférer directement avec le système endocrinien au

niveau de la synthèse des hormones, de leur métabolisation ou encore de leur transport (**Figure 1**).

Certains PE peuvent ainsi cibler la stéroïdogénèse, qui est le processus de biosynthèse des hormones. Une enzyme qui a été mise en lumière par de nombreuses études chez les vertébrés est l'aromatase Cyp19, qui convertit l'androsténédione ou la testostérone respectivement en œstrone ou 17 $\beta$ -œstradiol. Il a en effet été démontré qu'un grand nombre de pesticides utilisés à travers le monde entier peuvent affecter (généralement inhiber) l'activité aromatase *in vitro* dans différents modèles de vertébrés (Mason *et al.*, 1985; Vinggaard *et al.*, 2000; Sanderson *et al.*, 2002; Zarn *et al.*, 2003; Heneweer *et al.*, 2004; Hinfray *et al.*, 2006). Des expositions en condition contrôlée de laboratoire ont démontré que les inhibiteurs d'aromatase peuvent produire des effets marqués sur le système endocrinien et sur le succès de reproduction des poissons (Ankley *et al.*, 2002). Par ailleurs, des études récentes suggèrent que l'altération de la stéroïdogénèse est associée à des effets délétères observés chez des poissons dans leur environnement naturel (Noaksson *et al.*, 2003; Lavado *et al.*, 2004). Du fait de leur mode d'action, basé sur l'inhibition des CYP, les azoles fongicides peuvent affecter la stéroïdogénèse, qui est un processus supporté par une cascade de réactions enzymatiques, dont des CYP.

## **II. Les azoles fongicides : des polluants émergents**

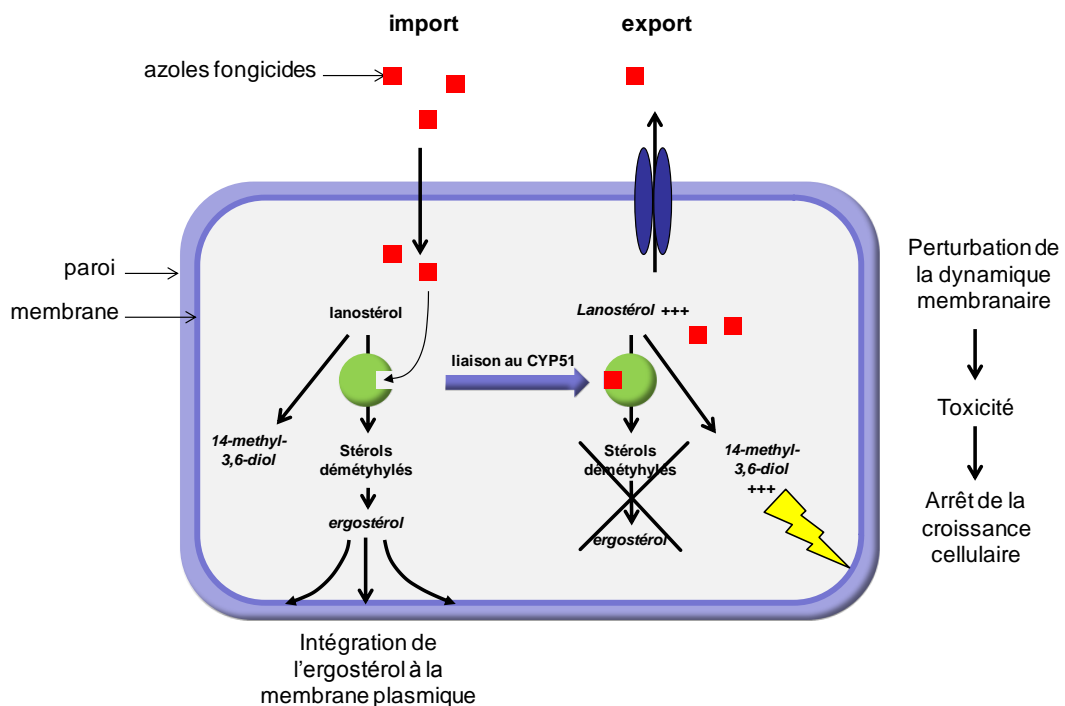
### **II.1. Définition et utilisation**

Les azoles fongicides sont des molécules montrant un large spectre d'action antifongique. Ils sont employés dans l'agriculture (phytopharmacie et médecine vétérinaire) et dans le traitement des mycoses chez l'homme. Par ailleurs, ils sont aussi utilisés dans le traitement de certaines maladies dépendantes des hormones stéroïdiennes sexuelles. Ils sont ainsi administrés à des patients pour le traitement de certains cancers pour son action anti-œstrogénique, comme par exemple pour traiter le cancer du sein chez des femmes post-ménopausées (Altundag and Ibrahim 2006).

## II.2. Mécanismes d'action des azoles antifongiques

En fonction de leur structure chimique, les composés azolés antifongiques appartiennent à différentes classes, comme les triazoles ou encore les imidazoles. Cependant, leur activité antifongique passe par le même mécanisme d'action : les azoles bloquent la conversion du lanostérol en ergostérol (EspinellIngroff 1997; Georgopapadakou 1998), un composant essentiel de la membrane cellulaire, en inhibant l'activité de l'enzyme 14 $\alpha$ -déméthylase (CYP51) qui appartient à la grande famille des cytochromes P450 (CYP) (Trosken *et al.*, 2004). Les azoles perturbent ainsi l'assemblage de la membrane cellulaire chez les champignons ou chez les levures, conduisant à la mort cellulaire (**figure 4**). De plus, l'inhibition de la synthèse d'ergostérol conduit à l'accumulation du lanostérol et d'autres stérols méthylés, interférant avec la fonction de l'ergostérol, ce qui contribue à perturber la structure de la membrane plasmique et à arrêter la croissance cellulaire (Hitchcock 1993). Cela va donc rendre la membrane cellulaire plus vulnérable et altérer l'activité de plusieurs enzymes transmembranaires, comme celles associées au transport de nutriments (Vandenbossche *et al.*, 1993) ou d'ions (Zhang *et al.*, 2010).

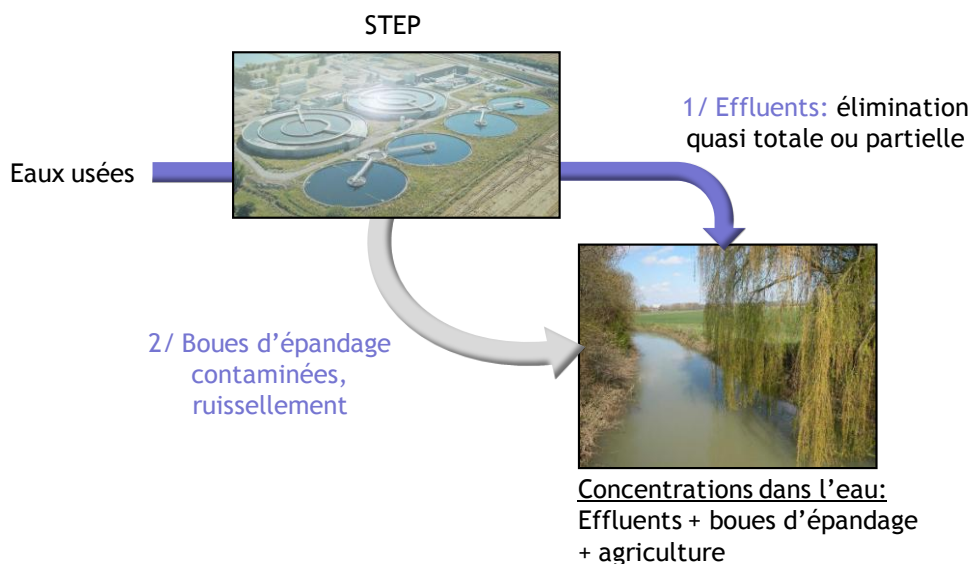
Ce mécanisme d'action biochimique est à la base de l'utilisation des azoles fongicides dans l'agriculture ou dans les thérapies antimycosiques humaines ou vétérinaires.



**Figure 4** : schéma du mécanisme d'action des azoles fongicides sur les champignons ou les levures

### II.3. Les fongicides azolés dans l'environnement aquatique

L'étude, pour leur maîtrise, de la contamination des ressources en eau par les pesticides et leurs résidus est un enjeu majeur dans la préservation de l'environnement.



**Figure 5** : Voies d'entrée des fongicides azolés dans le milieu aquatique (STEP= station d'épuration des eaux usées.)

L'utilisation des fongicides en agriculture, pour le traitement biocide des matériaux (Kahle *et al.*, 2008), comme le bois ou le béton, mais surtout comme produits pharmaceutiques et phytosanitaires est la principale source de contamination des milieux aquatiques. Par exemple, les fongicides à usage agricole vont pouvoir contaminer le milieu aquatique via le ruissellement des eaux de pluie (par exemple (DeLorenzo *et al.*, 2012)). Cependant, la principale contamination des écosystèmes aquatiques vient des stations d'épuration (STEP), puisque les composés azolés n'y sont que partiellement dégradés (par exemple (Hilton and Thomas 2003; Stamatis *et al.*, 2010; Van de Steene *et al.*, 2010)). Par ailleurs, les boues des STEP, qui servent à capter les azoles, vont également être une voie d'entrée secondaire dans les eaux via le ruissellement (**figure 5**). De plus, certaines caractéristiques des fongicides azolés, comme leur persistance dans l'eau et dans le sol (Bromilow *et al.*, 1999a; Bromilow *et al.*, 1999b), due à leur stabilité face à la dégradation hydrolytique, photolytique ou biologique, soulèvent des questions concernant leur impact sur les écosystèmes aquatiques. Leur propriété hydrophobe (log Kow élevé) en font aussi des composés qui vont potentiellement se fixer sur les sédiments et être bioaccumulés dans les tissus adipeux des organismes aquatiques (Peschka *et al.*, 2007).

Cependant, les travaux visant à étudier l'occurrence environnementale des fongicides azolés dans les eaux usées et les eaux de surface ou souterraines sont relativement limités et récents (par exemple (Stan and Heberer 1997; Thomas and Hilton 2004; Lacey *et al.*, 2012)). En effet, les mesures dans l'environnement sont réalisées depuis environ 10- 15 ans seulement alors que les fongicides azolés sont produits, pour certains, depuis plus de 40 ans. En cela, on peut dire que ce sont des polluants émergents, car bien qu'ils existent depuis longtemps, leur mesure dans l'environnement est relativement récente et leurs effets biologiques sont encore peu étudiés. A titre d'exemple, le clotrimazole a été synthétisé pour la première fois en 1969 (OSPAR 2005) et les premiers travaux rapportant des concentrations réelles dans les eaux de surface aux Royaume-Unis datent de 2004 – 2005 (Thomas et al., 2004; Roberts and Thomas 2005).

Depuis ces premiers travaux, plusieurs études ont permis de rendre compte de la contamination environnementale par les azoles dans différents compartiments des écosystèmes. Les tableaux qui suivent regroupent, de manière non exhaustive mais représentative, les concentrations de différents azoles mesurées dans les eaux de surface (**Tableau 2**), dans les affluents (ou tributaires) et les effluents de stations d'épuration (**Tableau 3**), ainsi que dans les boues de stations d'épuration (**Tableau 4**).

Dans les eaux de surface, les concentrations en azoles vont de l'ordre du ng/L à plusieurs centaines de ng/L (**Tableau 2**).

**Tableau 2** : Concentrations en azoles dans les eaux de surface

Utilisation	Classe	Substance	Lieu	concentrations (ng/L)	référence
pharmaceutique	imidazole	<b>clotrimazole</b>	estuaires, Royaume-Uni	<b>BDL-22</b>	<i>Thomas et al., 2004</i>
			Tyne, Royaume-Uni	<b>6-34</b>	<i>Roberts et al., 2005</i>
			Allemagne	<b>3-4</b>	<i>Peschka et al., 2007</i>
			Pearl, Chine	<b>4</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
		<b>flubendazole</b>	Belgique	<b>0,3-4,6, max 20,2</b>	<i>Van De Steene et al., 2010</i>
		<b>ketoconazole</b>	Pearl, Chine	<b>1</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
		<b>ketoconazole</b>	Belgique	<b>&lt;LOD</b>	<i>Van De Steene et al., 2010</i>
		<b>miconazole</b>	Pearl, Chine	<b>2</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Belgique	<b>&lt;LOD</b>	<i>Van De Steene et al., 2010</i>
		<b>rabeprazole</b>	Belgique	<b>&lt;LOD</b>	<i>Van De Steene et al., 2010</i>
pesticide	imidazole	<b>prochloraz</b>	Scania, Suède	<b>ND-2000</b>	<i>Kreuger, 1998</i>
	triazole	<b>cyproconazole</b>	Grèce	<b>13.8</b>	<i>Stamatis et al., 10</i>
		<b>fluquinconazole</b>	Lyon, France	<b>ND</b>	<i>Baugros et al., 08</i>
		<b>penconazole</b>	Grèce	<b>8.82</b>	<i>Stamatis et al., 10</i>
		<b>propiconazole</b>	Pearl, Chine	<b>6.6</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Belgique	<b>1,9-85,9, max 178,3</b>	<i>Van De Steene et al., 2010</i>
		<b>tebuconazole</b>	Lyon, France	<b>28.9-30</b>	<i>Baugros et al., 08</i>
			Pearl, Chine	<b>3</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Grèce	<b>73.39</b>	<i>Stamatis et al., 10</i>
		<b>tetraconazole</b>	Lyon, France	<b>ND</b>	<i>Baugros et al., 08</i>

ND : Non détecté, LOD : Limite de détection, BDL : en dessous de la limite de détection

Par rapport aux eaux de surface, les concentrations en azoles sont globalement plus élevées aux niveaux des affluents et les molécules sont partiellement dégradées ou captées par des boues, d'où des concentrations souvent plus faibles au niveau des effluents. Cependant, les pourcentages de dégradation entre les entrées et les sorties de STEP sont différents en fonction de la molécule (**tableau 3**). Par exemple, la concentration en miconazole est fortement diminuée (par exemple 89% dans une STEP en Belgique, mesures réalisées en hiver-janvier, (Van de Steene et al., 2010) alors que la concentration en propiconazole est globalement moins diminuée (par exemple 33% dans la même STEP de Belgique, mesures réalisés en hiver), (Van de Steene et al., 2010). Une quantité non négligeable des azoles est donc captée par les boues de STEP, dans lesquelles ils atteignent des concentrations allant du µg/kg au mg/kg (**tableau 4**).



**Tableau 3** : Concentrations en azoles dans les affluents et les effluents de stations d'épuration en Europe

Utilisation	Classe	Substance	Lieu	affluent (ng/L)	effluent (ng/L)	% élimination	ref
pharmaceutique	imidazole	clotrimazole	Tyne, Royaume-Uni	NA	10-33	*	Roberts et al., 05
			Howdon, Royaume-Uni	23-33	10-27	18,2-56,5	Roberts and Thomas, 2006
			Allemagne	20	9	55	Peschka et al., 07
			Suisse	64	4	94	Khale et al., 2008
		kétoconazole	Dublin, Irlande	LOQ-500	LOQ-8500	*	Lacey et al., 2011
			Belgique (janvier)	51,6	21,2	58,9	Van de Steene et al., 2010
			Belgique (avril)	19,5	34,8	*	Van de Steene et al., 2010
		flubendazole	Belgique (janvier)	221,2	214,5	3	Van de Steene et al., 2010
			Belgique (avril)	85,6	239,3	*	Van de Steene et al., 2010
		miconazole	Belgique (janvier)	337,9	35,7	89	Van de Steene et al., 2010
	Belgique (avril)	78,9	<LOD	>87	Van de Steene et al., 2010		
pesticide	triazole	fluconazole	Suisse	81	52	35	Khale et al., 2008
	triazole	cyproconazole	Grèce	313,6	112,5	64	Stamatis et al., 2010
		propiconazole	Suisse (Zürich)	10	10	0	Khale et al., 2008
	penconazole	Belgique (janvier)	54,7	41,6	24	Van de Steene et al., 2010	
		Belgique (avril)	3889,3	3561,6	8,4	Van de Steene et al., 2010	
		Grèce	47,19	12,98	72	Stamatis et al., 2010	
	tebuconazole	Suisse	2	2,33	*	Khale et al., 2008	
		Grèce	564,1	232,9	59	Stamatis et al., 2010	

ND = Non détecté ; LOD = Limite de détection ; LOQ = Limite de quantification

**Tableau 4** : Concentrations en azoles dans les boues de station d'épuration

Utilisation	Classe	Substance	Lieu	Concentrations (µg/kg)	ref
pharmaceutique	imidazole	<b>clotrimazole</b>	Pear, Chine	<b>190 - 1442</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Suède	<b>30 - 120</b>	<i>Lindberg et al., 2010</i>
			Madrid, Espagne	<b>170 - 1000</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>ketoconazole</b>	Suède	<b>280 - 910</b>	<i>Lindberg et al., 2010</i>
			Madrid, Espagne	<b>60 - 4500</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
			Pear, Chine	<b>194 - 437</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
		<b>econazole</b>	Suède	<b>210 - 1000</b>	<i>Lindberg et al., 2010</i>
			Pear, Chine	<b>54 - 140</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Madrid, Espagne	<b>2 - 30</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>miconazole</b>	Suède	<b>ND - 970</b>	<i>Lindberg et al., 2010</i>
			Pear, Chine	<b>238 - 1405</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
pesticide	triazole	<b>fluconazole</b>	Suède	<b>ND</b>	<i>Lindberg et al., 2010</i>
			Madrid, Espagne	<b>ND - 60</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>prochloraz</b>	Madrid, Espagne	<b>ND - 8</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>cyproconazole</b>	Madrid, Espagne	<b>&lt; LOD</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>tetraconazole</b>	Madrid, Espagne	<b>ND - 10</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>propiconazole</b>	Pearl, Chine	<b>&lt; MQL</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Madrid, Espagne	<b>ND - 32</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>epoxiconazole</b>	Pearl, Chine	<b>ND - 20</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>
		<b>tebuconazole</b>	Pearl, Chine	<b>ND - &lt;MQL</b>	<i>Huang et al., 2010</i>
			Madrid, Espagne	<b>ND - 14</b>	<i>Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011</i>

ND : Non détecté, LOD : Limite de détection, MQL : limite de quantification

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au clotrimazole, qui est un fongicide pharmaceutique dont la principale application est le traitement des infections fongiques dermatologiques et gynécologiques. Il figure depuis 2002 sur la liste OSPAR des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires, dans le but de réduire son émission et sa concentration dans l'environnement marin. Au sein de l'Union Européenne, il n'existe qu'un seul site de production (en Espagne) et qu'un seul fabricant. Ce site produit environ 10 tonnes de clotrimazole par an en Europe et une quantité identique est importée. Au total, il y a donc 20 tonnes de clotrimazole qui sont produites ou importées par an afin d'être utilisés principalement comme fongicide dans l'industrie pharmaceutique. La principale source de contamination en clotrimazole dans l'environnement aquatique est le réseau des eaux usées qui va causer son introduction dans le milieu aquatique via les STEP (OSPAR 2005). Il est retrouvé à des concentrations allant du ng/L à plusieurs

dizaines de ng/L dans les eaux de surface (**tableau 2**) et est fortement concentré dans les boues de STEP (**tableau 4**). Concernant ces effets biologiques, on sait qu'il est capable d'inhiber de CYP dans des modèles *in vitro* de mammifère ou de poisson (Vinggaard *et al.*, 2002; Hinfray *et al.*, 2006). Par contre, ces effets biologiques *in vivo* sont très peu étudiés.

#### II.4. Effets biologiques des azoles

Les azoles fongicides vont agir par inhibition de l'activité d'un CYP chez les champignons. Cependant, leur spectre d'action est très large et ils vont pouvoir aller cibler des CYP chez d'autres espèces, dont celles des vertébrés (Mason *et al.*, 1985; Trosken *et al.*, 2004b). Les azoles sont notamment connus pour cibler une enzyme de la biosynthèse hormonale (stéroïdogénèse) : l'aromatase (Cyp19). De nombreuses études chez des modèles *in vitro* mammifères ou poissons montrent en effet une inhibition de l'activité aromatase testiculaire ou cérébrale (**tableau 5**). Par ailleurs, les azoles peuvent également cibler d'autres enzymes de la stéroïdogénèse, comme par exemple le Cyp17 chez les mammifères (Ayub and Levell 1987; Eil 1992).

Des azoles, comme le prochloraz, sont également connus pour interagir avec des récepteurs nucléaires, comme par exemple le récepteur des androgènes (AR, (Andersen *et al.*, 2002; Birkhoj *et al.*, 2004)). Certains azoles sont aussi décrit comme pouvant interagir avec d'autres récepteurs, comme le PXR, en tant qu'agoniste (par exemple le propiconazole (Lemaire *et al.*, 2004)) ou antagoniste (par exemple le kétoconazole, (Ekins *et al.*, 2007)).

En revanche, les effets *in vivo* des azoles chez les vertébrés, et notamment chez les poissons, sont beaucoup moins renseignés. Des études récentes rapportent cependant des modifications de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse. Le **tableau 6** montrent, de manière non exhaustive les variations d'expression de gènes chez des poissons téléostéens.

Au niveau des effets populationnels, aucune étude sur des poissons n'a été réalisée. En revanche, une étude récente a montré une inhibition de croissance d'une population de périphyton suite à une exposition au clotrimazole (Porsbring *et al.*, 2009). Le mécanisme mis en évidence dans le cadre de cette étude implique l'inhibition du CYP 14 $\alpha$  déméthylase chez ces communautés de micro algues à des concentrations environnementales.

**Tableau 5 : Profil perturbateur endocrinien de plusieurs azoles fongicides (inspiré de Tobias Frische et Pia Kotschik, UBA, SETAC, Milan, 2011, Allemagne)**

	prochloraz	époxyconazole	flusilazole	propiconazole	difenoconazole	tebuconazole	cyproconazole
Quantité vendue en Allemagne en 2009 (tonnes)	100 - 250	250 - 1000	25 - 100	100 - 250	25 - 100	250 - 1000	10 - 25
Preuves de l'inhibition de la stéroïdogénèse (aromatase <i>in vitro</i> )	Oui (1 - 10)	Oui (1, 4, 5, 7)	Oui (1, 7)	Oui (1 - 3, 5 - 7, 8, 9, 11)	Oui (2, 6, 9)	Oui (1, 2, 5, 7)	Oui (1, 7)
Potentiel d'inhibition de l'aromatase <i>in vitro</i> (IC <sub>50</sub> , µM)	0,047	1,44	0,055	3,2	pas de données	5,8	8,5
Preuves de perturbations endocriniennes <i>in vivo</i> : études mammifères	Oui ↓ testostérone, ↓ de la distance anneau génital chez le mâle et ↑ chez la femelle, ↑ de la durée de gestation, ↓ fertilité (12, 16, 17)	Oui perturbation de la balance hormonale, ↑ de la distance anneau-génital chez la femelle, ↑ de la durée de gestation, ↓ fertilité (13, 15)	Oui ↓ testostérone et ↓ oestradiol (sérum), ↓ du poids du placenta, ↑ de la durée de gestation (12)	Oui ↑ testostérone, ↑ de la distance anneau-génital chez le mâle, ↑ du poids des testicules (12, 14, 15)	(Non) les informations de toxicologie disponibles n'indiquent pas de perturbation endocrinienne	Oui Perturbation de la balance hormonale chez les mâles, ↑ de la distance anneau-génital chez les femelles (12, 13, 15)	(Oui) toxicité hépatique observée à des plus faibles doses que les effets sur reproduction et développement (12)
Preuves de perturbations endocriniennes <i>in vivo</i> : études poissons	Oui ↓ de la Vtg chez les femelles, changement dans le sexe-ratio vers les mâles, ↓ reproduction	Oui ↓ de la Vtg (mâles et femelles, changement dans le sexe-ratio vers les mâles, ↓ reproduction	Oui ↓ de la Vtg (mâles et femelles, pas de changement de sexe-ratio, ↓ reproduction	(Oui) ↓ reproduction (pas de preuves claires au regard des "endpoints regardés"	(Oui) changement dans le sexe-ratio vers les mâles, ↓ reproduction	(Oui) ↓ croissance oocytaire, ↓ de la maturité sexuelle, ↓ reproduction	(Oui) FLC: ↓ reproduction, ↓ Vtg chez les femelles, études de screening négatives
Facteur de bioconcentration (BCF) chez les poissons	393	59,8	205	116	30	78	35

Les données de quantités d'azoles vendus en 2009 ont été rapportées par le BVL ([www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de)), les données toxicologiques et écotoxicologiques ont été compilées par l'EFSA ; les valeurs d'IC<sub>50</sub> (50% d'inhibition) sont issues de Trösken et al., 2004.

#### References:

- 1) Trösken et al. (2004): Comparative Assessment of the Inhibition of Recombinant Human CYP19 (Aromatase) by Azoles Used in Agriculture and as Drugs for Humans
- 2) Sanderson et al. (2002): Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells
- 3) Vinggaard et al. (2000): Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*.
- 4) Henneer et al. (2004): Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line and R2C cells
- 5) Kjaerstad et al. (2010): Endocrine disrupting effects *in vitro* of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals
- 6) Hinfray et al. (2006): Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances
- 7) Trösken et al. (2006): Comparison of lanosterol-14- $\alpha$ -demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles
- 8) Andersen et al. (2002): Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity *in Vitro*
- 9) Sanderson & Berg (2003): Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway
- 10) Monod et al. (1993): Inhibition of Ovarian Microsomal Aromatase and Follicular Oestradiol Secretion by Imidazole Fungicides in Rainbow Trout
- 11) Götz et al. (2009): Inhibition of rat and human steroidogenesis by triazole antifungals
- 12) Zarn et al. (2003): Azole Fungicides Affect Mammalian Steroidogenesis by Inhibiting Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase and Aromatase
- 13) Taxvig et al. (2007): Endocrine-Disrupting Activities *In Vivo* of the Fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole
- 14) Goetz et al. (2007): Disruption of Testosterone Homeostasis as a Mode of Action for the Reproductive Toxicity of Triazole Fungicides in the Male Rat
- 15) Taxvig et al. (2008): Endocrine-disrupting properties *in vivo* of widely used azole fungicides
- 16) Vinggaard et al. (2002): Antiandrogenic Effects *In Vitro* and *In Vivo* of the Fungicide Prochloraz
- 17) Laier et al. (2006): Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz

**Tableau 6** : Variation de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse

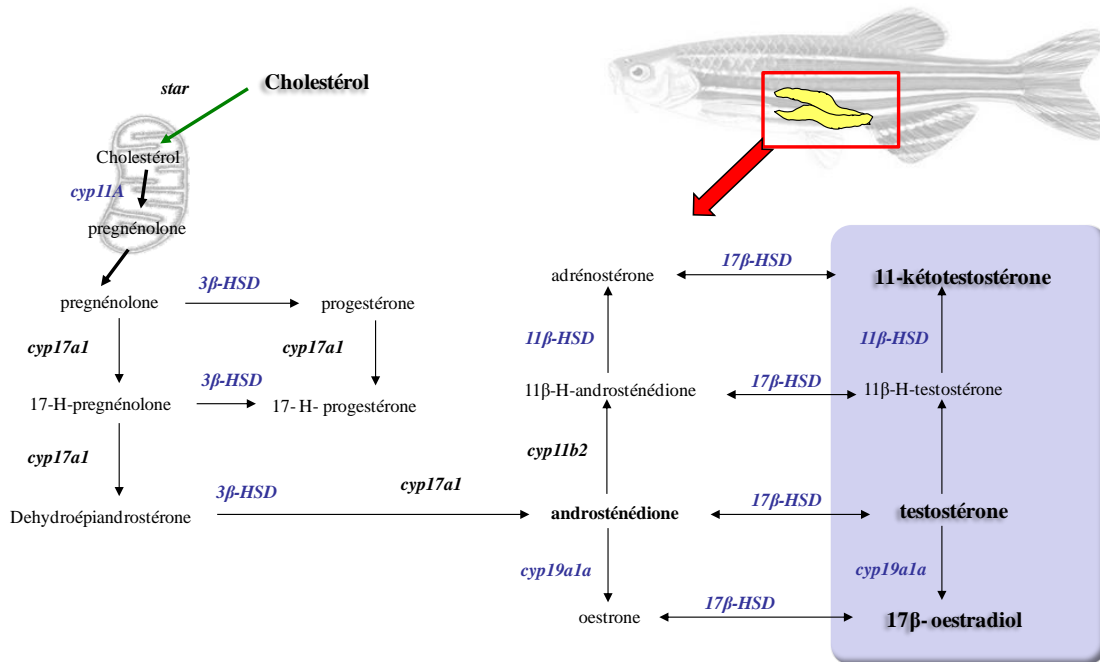
molécule	espèce /stade	concentration /durée	expression de gènes	référence
kétoconazole	fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> ) adulte	6 - 400 µg/L (21 jours)	↑ <i>cyp11a</i> and <i>cyp17a1</i>	Ankley <i>et al.</i> , 2007
prochloraz	Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) adulte	3 - 300 µg/L (7 jours)	↑ <i>cyp11c1</i> , <i>cyp17a1</i> , <i>hsd3b1</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
kétoconazole	adulte	3 - 300 µg/L (7 jours)	↑ <i>cyp11c1</i> , <i>cyp19a1a</i>	
kétoconazole	fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> ) adulte	6 - 400 µg/L (21 jours)	↑ <i>star</i>	Villeneuve <i>et al.</i> , 2007a

### III. La stéroïdogénèse

#### III.1. Définition

La stéroïdogénèse est un processus relativement conservé chez les vertébrés qui conduit à la biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir d'un précurseur commun, le cholestérol, élaboré lui-même à partir du lanostérol issu du squalène. Chez les poissons, comme chez les autres vertébrés, elle se déroule principalement dans les gonades (testicules et ovaires), mais aussi dans le cerveau et les glandes inter- rénales. Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle critique dans la régulation de la reproduction (gamétogenèse, caractères sexuels secondaires, comportement ...), la croissance et le développement, ainsi que dans le comportement. Elles participent également à l'homéostasie générale de l'organisme.

Les stéroïdes sont synthétisés à partir du cholestérol par une série de réactions enzymatiques catalysées principalement par plusieurs cytochromes P450 ainsi que par des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSDs) (**figure 6**) :



**Figure 6 :** Schéma de la stéroïdogénèse chez les poissons

### III.2. Les acteurs moléculaires de la stéroïdogénèse testiculaire

En amont de la cascade de réactions enzymatiques, une étape clef est le transport du cholestérol, formé à partir de la conversion du lanostérol par la 14 $\alpha$ -deméthylase (CYP51), dans la membrane interne de la mitochondrie. Ce transport est assuré par la protéine STeroidogenic Acute Regulatory protéin (StAR) (Miller 1988; Stocco and Clark 1996; Stocco 2001). Une fois dans la mitochondrie, le cholestérol est converti en pregnénolone (P5) par un système enzymatique catalysé par un cytochrome P450 possédant une activité de clivage de la chaîne latérale du cholestérol : c'est le cytochrome P450 scc (side-chain clivage), également appelée Cyp11a. Il catalyse la première réaction enzymatique de la chaîne qui est une étape limitante clef de la stéroïdogénèse (Villeneuve *et al.*, 2007a; Arukwe *et al.*, 2008). La pregnénolone quittant la mitochondrie devient le substrat pour le cytochrome P450c17 (Cyp17a1) qui possède deux activités (1) l'activité 17 $\alpha$ -hydroxylase qui converti la prégnénolone et la progestérone en 17 $\alpha$ -hydroxy pregnénolone et en 17 $\alpha$  -hydroxyprogestérone, respectivement, et (2) l'activité 17,20-lyase qui clive la liaison C17, 20 pour convertir la 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone en déhydroépiandrostérone (DHEA) ou la 17  $\alpha$  -hydroxyprogestérone en androsténédione (Wang and Ge 2004). On distingue 2 voies de synthèse, la voie  $\Delta$ 5 des stéroïdes possédant une double liaison entre le carbone 5 et le carbone 6, qui va conduire de la pregnénolone à la déhydroépiandrostérone, puis à

l'androsténédiol. La 3 $\beta$ -hydroxystéroïde dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) va permettre de passer de la voie  $\Delta 5$  à la voie  $\Delta 4$  des stéroïdes possédant une double liaison entre le carbone 4 et le carbone 5. L'androsténédione est un stéroïde clef pour la voie  $\Delta 4$  de la stéroïdogénèse. En effet, l'androsténédione est la source des androgènes ; androsténédione et testostérone étant, eux-mêmes, des substrats pour le cytochrome P450c11 (Cyp11c1) 11 $\beta$ -hydroxylase qui permet d'aboutir à la synthèse des androgènes 11-oxygénés, mais aussi substrat pour le cytochrome P450aro aromatase CYPs (Cyp19) permettant la synthèse des oestrogènes. Le Cyp11c1 permet de convertir l'androsténédione en 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione qui est pris en charge par 2 déshydrogénases, la 11 $\beta$ -hydroxystéroïdes deshydrogénase (11 $\beta$ -HSD) et la 17 $\beta$ -hydroxystéroïdes deshydrogénase (17 $\beta$ -HSD), afin de produire les androgènes 11-oxygénés. Chez les poissons, ce sont les androgènes 11-oxygénés, comme la 11-kétotestostérone (11-KT), qui sont les plus synthétisés dans les testicules (Borg 1994). On distingue cependant deux formes d'aromatase : l'aromatase dite gonadique Cyp19a (la gonade est le lieu principal d'expression) et l'aromatase dite cérébrale Cyp19b (le cerveau est le principal lieu d'expression) (Tchoudakova and Callard 1998; Chang *et al.*, 2005). C'est une particularité des poissons, deux gènes codant pour des protéines distinctes ayant des propriétés catalytiques différentes (Zhao *et al.*, 2001; Gonzalez and Piferrer 2002). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'anguille semble n'avoir qu'une aromatase de type cérébrale, alors que la truite possède une aromatase gonadique et deux variants d'aromatase cérébrale (Jeng *et al.*, 2012).

### III.3. La stéroïdogénèse cérébrale

Comme mentionné ci-dessus, chez les poissons adultes téléostéens, le cerveau est connu pour avoir une forte activité aromatase (Pasmanik and Callard 1985) du fait de la forte expression de l'aromatase b (Cyp19a1b) dans les cellules gliales radiaires (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2005). Ces cellules gliales radiaires qui expriment *cyp19a1b* sont connues pour être des cellules souches du cerveau et participent à la croissance constante du cerveau chez les adultes ainsi qu'à l'activité neurogénique (Pellegrini *et al.*, 2007). Cela suggère que les œstrogènes sont impliqués dans la modulation de la neurogenèse chez les poissons (Diotel *et al.*, 2010; Vosges *et al.*, 2010). De plus, des travaux récents ont démontré que les ARN messagers pour *cyp11a1*, *hsd3b1*, and *cyp17a1* sont exprimés dans le cerveau et montrent un patron d'expression similaire à l'expression de *cyp19a1b*, suggérant que les

cellules gliales radiaires pourraient exprimer la série entière d'enzymes clefs de la stéroïdogénèse nécessaires pour produire les œstrogènes à partir du cholestérol (Diotel *et al.*, 2011). Dans la même étude, les auteurs ont montré que le cerveau du poisson zèbre a la capacité de produire des neurostéroïdes (Diotel *et al.*, 2011).

Cependant, au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés, à travers la mesure de paramètres biologiques, au lien entre la stéroïdogénèse testiculaire et la spermatogenèse suite à des expositions à un PE.

## IV. La spermatogenèse chez les poissons

### IV.1. Généralité

La spermatogenèse est un processus cyclique, complexe et orchestré durant lequel un faible nombre de cellules souches spermatogoniales diploïdes produisent un grand nombre de spermatozoïdes portant un génome haploïde et recombiné (Guan *et al.*, 2006). Ce processus implique des interactions cellulaires, paracrines et endocrines et les caractéristiques générales de la spermatogenèse sont partagées par toutes les espèces de vertébrés (Schulz *et al.*, 2010). Les spermatozoïdes, qui sont des cellules germinales hautement différenciées, sont issus d'autres cellules germinales moins différenciées. La survie et le développement de ces cellules germinales dépendent de leur contact étroit et continu avec les cellules de Sertoli. Il est généralement admis que les cellules souches spermatogoniales peuvent avoir deux types de division chez les vertébrés, soit une division d'auto renouvellement qui garantit une fertilité sur le long terme ou une division qui produit deux cellules filles, qui sont destinées à se différencier plus tard en spermatozoïdes après plusieurs étapes.

### IV.2. Structure du testicule

Le testicule est composé de 2 principaux compartiments chez tous les vertébrés:

- *Le compartiment intertubulaire (ou interstitiel)* : il contient les cellules stéroïdogènes de Leydig, les vaisseaux lymphatiques et sanguins, les mastocytes, les cellules neurales et le tissu conjonctif. Ce tissu conjonctif est en continuité avec la tunique albuginée, qui joue un



rôle de tissu conjonctif de soutien. La tunique albuginée ne doit pas être confondue avec la barrière hémato- testiculaire, qui joue un rôle dans l'isolement des cellules germinales, comme la prévention de réactions auto- immune. Cette barrière hémato-testiculaire est constituée par les cellules de Sertoli, jointes par des jonctions inter- cellulaires serrées, et non par l'albuginée.

- *Le compartiment tubulaire* est délimité par une membrane basale et des cellules myoïdes périvitubulaires et il abrite l'épithélium germinale. L'épithélium contient 2 types cellulaires : les cellules somatiques de Sertoli et les cellules germinales. Ces cellules germinales sont retrouvées à différents stades de développement. Les cellules germinales peuvent survivre grâce aux cellules de Sertoli, donc le nombre de cellules de Sertoli détermine la capacité spermatogène des testicules. Cela fait que les cellules de Sertoli sont une cible importante des systèmes de signalisation de la spermatogenèse (Matta *et al.*, 2002).

Chez les vertébrés anamniotes (les poissons et les amphibiens), contrairement aux vertébrés amniotes, il y a une spermatogenèse de type cystique : dans les tubules spermatogéniques, les extensions cytoplasmiques des cellules de Sertoli vont former des cystes qui enveloppent un seul groupe de cellules germinales provenant d'une seule spermatogonie. Ces cellules germinales se sont développées de manière synchrone et les cellules de Sertoli, formant des cystes, retiennent leur capacité à proliférer aussi chez le poisson adulte.

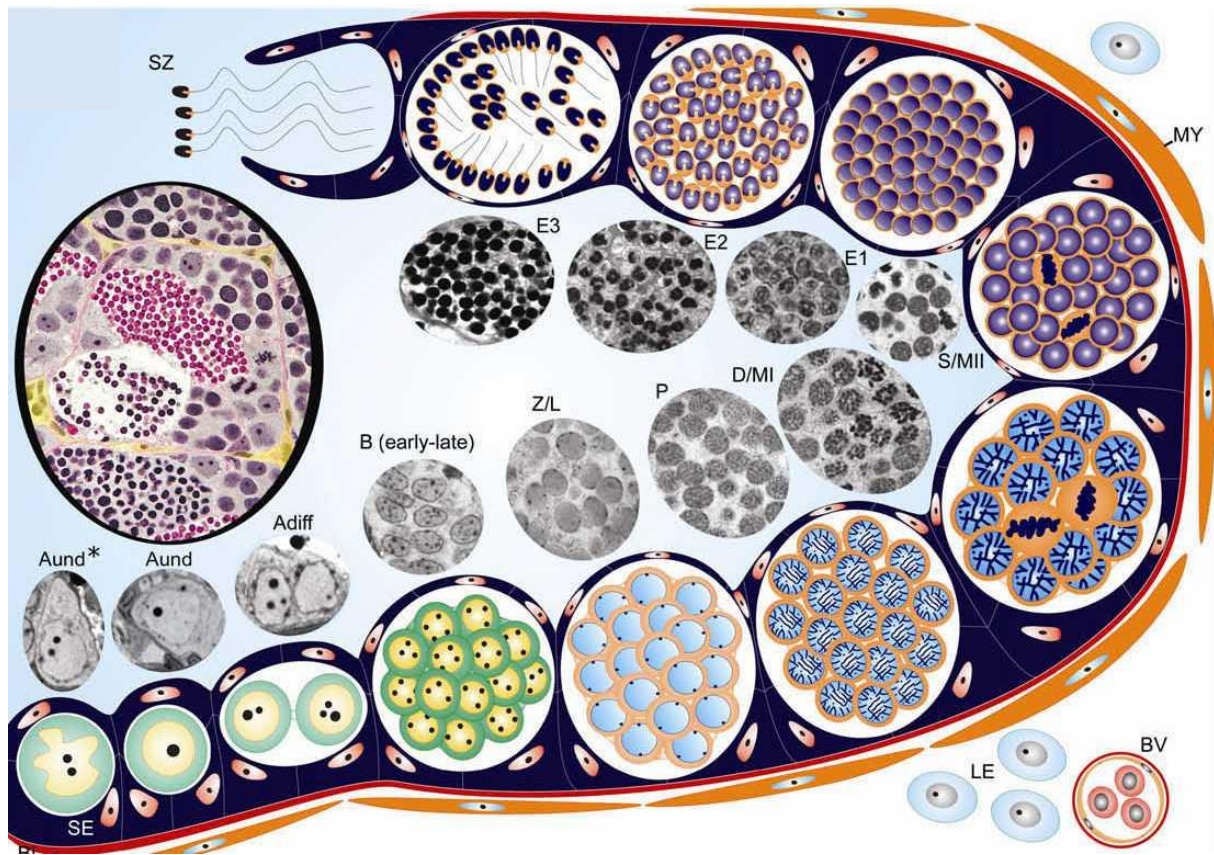
Donc, chez le poisson, il y a un cyste spermatogénique formé par un groupe dynamique de cellules de Sertoli entourant et nourrissant des cellules germinales. Le compartiment tubulaire va contenir des groupes de cellules germinales de différentes tailles à différents stades de la spermatogenèse (Schulz *et al.*, 2010).

La principale fonction des cellules de Sertoli est d'assurer la survie des cellules germinales, leur développement, et le fonctionnement de leur physiologie. De plus, elles sécrètent un fluide qui s'accumule dans le lumen tubulaire, elles phagocytent les cellules germinales apoptotiques, les corps résiduels et le sperme résiduel (Vilela *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2008). C'est la première cellule somatique à se différencier dans les testicules des vertébrés et ce type cellulaire joue un rôle crucial en dirigeant le développement et la différenciation des testicules (DiNapoli and Capel 2008). Chez les poissons, le nombre de cellules germinales et le volume qu'elles occupent augmentent fortement au sein des cystes pendant la spermatogenèse et le nombre de cellules de Sertoli par cyste augmente également.

#### IV.3. Processus de la spermatogenèse chez les vertébrés

La spermatogenèse est un processus très organisé et coordonné, dans lequel des spermatogonies diploïdes prolifèrent et se différencient en spermatozoïdes matures. La durée de ce processus chez les poissons est généralement plus courte que chez les mammifères et est également influencée par la température de l'eau (Nobrega *et al.*, 2009). Chez les vertébrés, la spermatogenèse peut se diviser en 3 phases :

- (1) *La phase mitotique ou spermatogoniale* : elle concerne les différentes générations de spermatogonies (les spermatogonies indifférenciées, incluant les cellules souches, les spermatogonies différenciées ou en différenciation) ;
- (2) La phase méiotique : avec les spermatocytes primaires et secondaires ;
- (3) La phase spermiogénique : avec les spermatides haploïdes émergents de la méiose et se différenciant, sans prolifération supplémentaire, en spermatozoïdes (motile, flagellé et vecteur du génome paternel).



**Figure 7:** schéma d'une coupe testiculaire de poisson illustrant les relations entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales ainsi que la progression de la spermatogenèse (cystique chez les poissons). L'épithélium germinale contient les cellules de Sertoli (SE) et les cellules germinales, délimitées par la lame basale (BL) et les cellules myoïdes péritubulaires (MY). Les cellules interstitielles de Leydig (LE) et les vaisseaux sanguins (BV) sont montrés. Spermatogonies de type A indifférenciées ( $A_{und}^*$ , cellules souches); spermatogonies de type A indifférenciées ( $A_{und}$ ); spermatogonies de type A différenciées ( $A_{diff}$ ); spermatogonies de type B (early-late); spermatocytes primaires leptoténique/zygoténique (L/Z); spermatocytes primaires pachyténique (P); spermatocytes diploténique /métaphase I (D/MI); spermatocytes secondaires /métaphase II (S/MII); spermatides précoces (E1), intermédiaires (E2) et finals (E3); spermatozoïdes (SZ), (Schulz et al., 2010)

#### IV.4. Processus de la spermatogenèse chez les poissons

Chez les poissons, les différents stades cellulaires de développement de la spermatogenèse (spermatogonies, spermatocytes, spermatides, spermatozoïdes) sont comparables à ceux des autres vertébrés (Schulz et al., 2010) (**figure 7**). Les spermatogonies indifférenciées de type A ( $A_{und}$ ) donnent naissance aux spermatogonies différenciées de type A ( $A_{diff}$ ), partageant encore des caractéristiques morphologiques avec les  $A_{und}$ , mais avec un potentiel d'auto- renouvellement fortement réduit. Un engagement irréversible vers une future maturation et une modification des aspects morphologiques caractérisent les spermatogonies de type B. Il y a plusieurs générations de spermatogonies B par cyste et les spermatogonies B

d'un même cyste sont liées par des ponts cytoplasmiques. Après la mitose finale, les spermatogonies B se différencient en spermatocytes primaires diploïdes qui vont entrer en méiose (stade préleptotène). On distingue : les spermatocytes primaires ( $2n$ , première division méiotique), spermatocytes secondaires haploïdes (2ème division méiotique), les spermatides (différenciation sans prolifération), les spermatozoïdes. A la différence des mammifères, les spermatogonies ne sont pas en contact direct avec la lame basale chez les téléostéens, et elles sont toujours entièrement entourées des cellules de Sertoli.

Il est ici intéressant de noter que la taille des noyaux diminue avec le passage des spermatogonies A aux spermatogonies B et que les spermatogonies de types  $A_{und}$  présentent des structures de type nuage (structures denses aux électrons) situées entre le noyau et les mitochondries. Nous verrons au cours de ce travail de thèse l'importance de ces structures de type nuage, puisqu'elles sont constituées en partie de protéines spécifiques, Piwill ou encore Vasa, dont l'expression des gènes va être utilisée comme marqueur de ces types cellulaires précoces, comme les spermatogonies  $A_{und}$  (Houwing *et al.*, 2007).

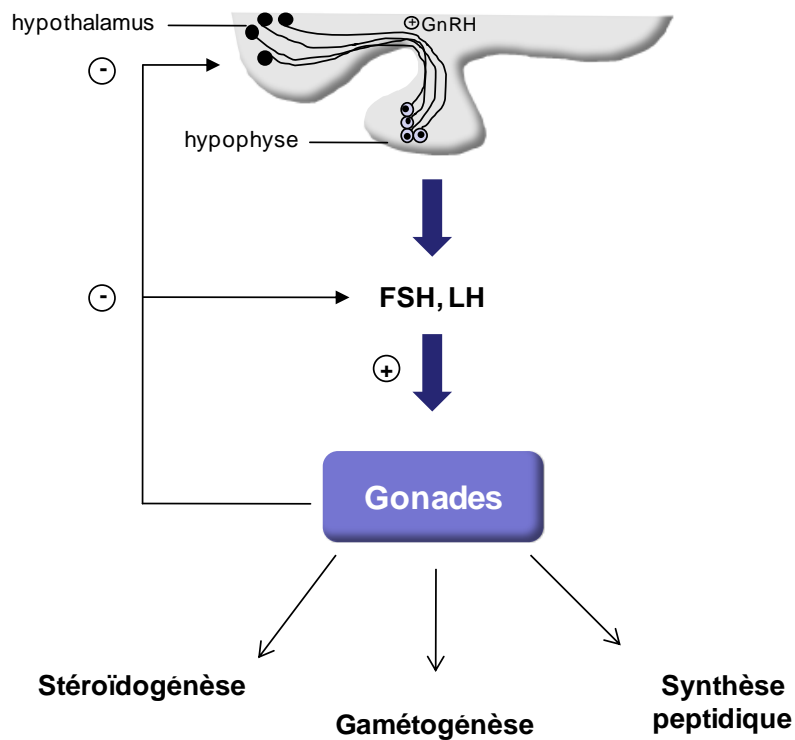
## **V. Le contrôle de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse chez les poissons téléostéens**

### **V.1. Le rôle central de l'axe Hypothalamus Hypophyse Gonade**

Chez tous les vertébrés, les processus de la stéroïdogénèse et de la gamétogénèse sont sous le contrôle de l'axe hypothalamus- hypophyse- gonade (axe HPG pour Hypothalamo-Pituitary- Gonad). Les principaux acteurs moléculaires sont les hormones glycoprotéiques, les gonadotropines Fsh et Lh, et les stéroïdes.

Les gonadotropines sont produites par les cellules hypophysaires. Leur synthèse ainsi que leur sécrétion sont sous le contrôle des neurones à GnRH, qui innervent directement les cellules gonadotropes hypophysaires chez les poissons téléostéens. La GnRH ainsi libérée se fixe sur des récepteurs spécifiques à 7 domaines transmembranaires (GnRH-R) stimulant ainsi la biosynthèse et la libération des hormones gonadotropes Fsh et Lh, qui régulent la physiologie testiculaire, à savoir la stéroïdogénèse et la gamétogénèse (**figures 8 et 9**).

Chez les téléostéens, deux ou trois variants de la GnRH (-I, -II ou -III) sont exprimés selon l'espèce (Gothilf *et al.*, 1996; Lethimonier *et al.*, 2004; Zohar *et al.*, 2010). La GnRH de type 3 (GnRH-3) est exprimée uniquement chez les poissons téléostéens et chez les espèces à deux variants, comme le poisson zèbre (GnRH-2 et GnRH-3), elle remplit la fonction hypophysiotrope. De plus, les neurones à GnRH-3 chez les poissons zèbres s'étendent des bulbes olfactifs à l'hypothalamus (Abraham *et al.*, 2008; Palevitch *et al.*, 2009).



**Figure 8 :** schéma de l'axe hypothalamus- hypophyse- gonades

Les gonadotropines Lh et Fsh sécrétées par l'hypophyse sont donc les régulateurs moléculaires directs qui interagissent avec leurs récepteurs transmembranaires au niveau gonadique. Ils sont couplés à des protéines G et l'activation de la voie AMP cyclique va permettre une transduction du signal intracellulaire (Ge 2005). Chez les vertébrés, les gonadotropines sont des glycoprotéines hétérodimériques composés de deux sous-unités. Chez les poissons, une sous unité  $\alpha$  commune, conférant l'affinité aux récepteurs est liée de manière non covalente à des sous unité  $\beta$  spécifiques : Lh $\beta$  et Fsh $\beta$ , qui déterminent l'activité biologique et la spécificité de l'hormone. Chaque sous-unité est codée par un gène distinct. Au niveau des acides aminés, la sous unité  $\alpha$  est la plus conservée (Li and Ford 1998) chez les espèces de poissons. La sous unité Fsh $\beta$  est, quant à elle, la moins conservée des deux sous-unités  $\beta$ , contrairement aux mammifères (Querat *et al.*, 2004).

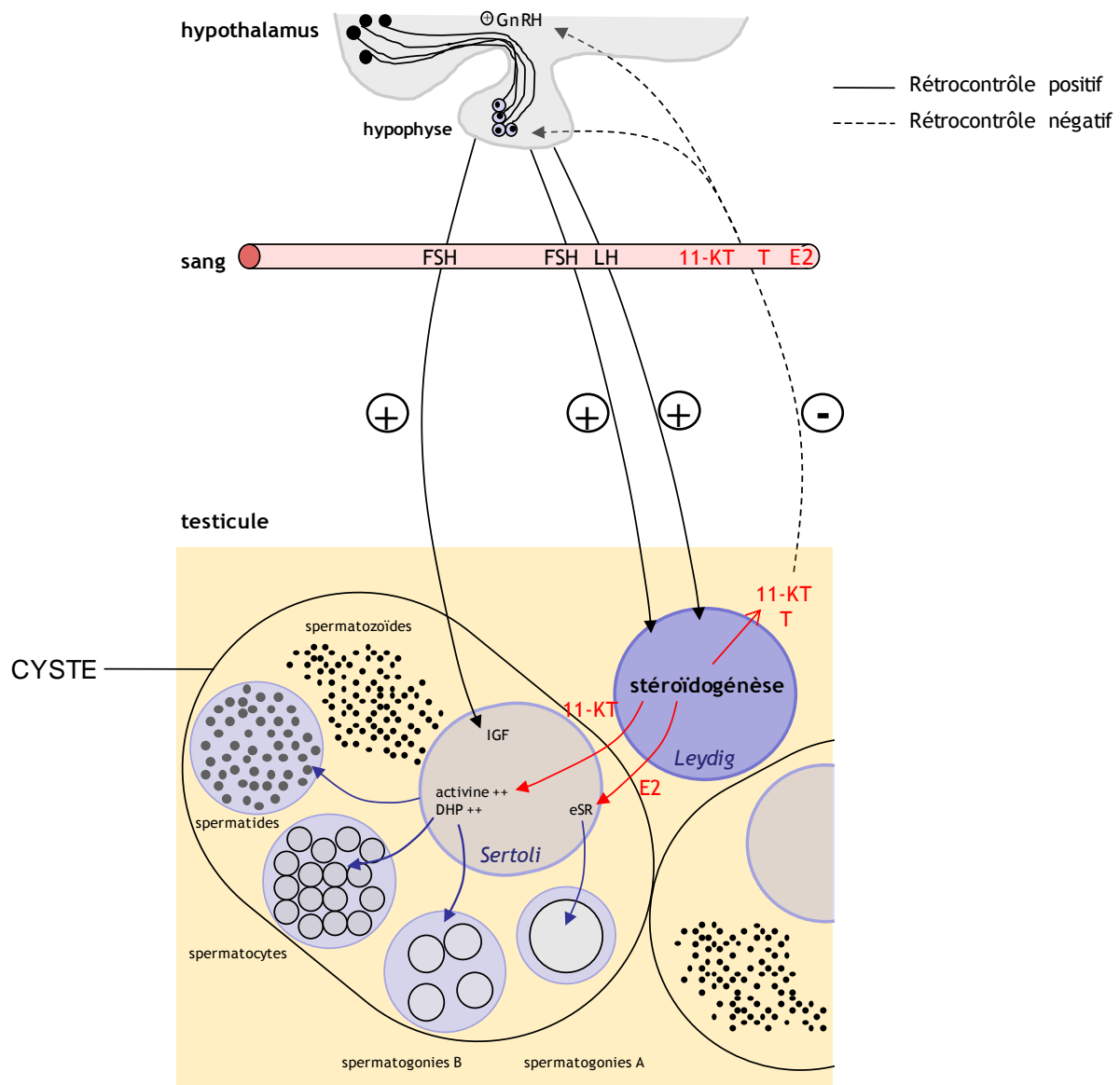
Deux points sont extrêmement importants en ce qui concerne leur activité biologique (1) la spécificité avec laquelle elles interagissent avec leurs récepteurs gonadiques FshR et LhR et (2) les sites cellulaires d'expression de ces récepteurs aux gonadotropines. Chez les mammifères, les gonadotropines interagissent avec leurs récepteurs gonadiques de manière très spécifique et les sites d'expression de ces récepteurs semblent bien compartimentés.

Ainsi, la Lh interagit avec son récepteur LhR au niveau des cellules de Leydig pour stimuler la stéroïdogénèse et donc la production de stéroïdes, alors que la Fsh vient se fixer sur son récepteur FshR pour réguler les fonctions sertoliennes, qui sont principalement orientées vers le support du développement des cellules germinales (Huhtaniemi and Themmen 2005). En revanche, chez les poissons, (1) la spécificité de liaison des gonadotropines à leurs récepteurs mais surtout (2) la localisation des sites d'expression des récepteurs aux gonadotropines divergent des mammifères et montrent des activités biologiques moins séparées pour Lh et Fsh. L'expression de FshR dans les cellules de Leydig explique la forte activité stéroïdogène de Fsh chez certaines espèces de poissons (Levavi-Sivan et al., 2010).

Ainsi chez les poissons, le FshR est principalement activé par la Fsh, comme chez le poisson chat Africain (Garcia-Lopez *et al.*, 2009) ou le barbus de rivière (Kazeto *et al.*, 2008) mais peut également l'être par la Lh à de fortes concentrations, lors de pics de concentration plasmatique de Lh (comme en période de ponte chez les femelles). En revanche, le LhR peut être considéré comme Lh- spécifique physiologiquement parlant (Schulz et al., 2010). Concernant la localisation des récepteurs aux gonadotropines, des études récentes ont montré que la protéine FshR était retrouvée à la fois dans les cellules de Sertoli mais également dans les cellules de Leydig chez l'anguille (Schulz et al., 2010). En accord avec ces résultats, le gène *fshr* s'exprime dans les deux types cellulaires chez le poisson chat Africain (Garcia-Lopez et al., 2009) tandis que l'expression de *lhcr* est restreinte aux cellules de Leydig. L'ensemble de ces données suggèrent donc que chez les poissons téléostéens, la stéroïdogénèse au niveau des cellules de Leydig est régulée par Lh et Fsh alors que les fonctions des cellules de Sertoli sont principalement régulées par Fsh (Schulz et al., 2010), qui est une hormone stéroïdogène puissante (Planas *et al.*, 1993).

Par ailleurs, des études montrent que la stéroïdogénèse médiée par Fsh stimule les stades précoces de la spermatogénèse, comme la prolifération des spermatogonies (Campbell *et al.*, 2003), tandis que Lh est principalement impliquée dans les étapes finales de la maturation. En accord avec ces notions, Fsh est la gonadotropine clef pour l'initiation de la spermatogénèse, comme le montre par exemple des travaux basés sur de la culture d'explant testiculaire d'anguille (Ohta *et al.*, 2007). Les effets de la Fsh sur la spermatogénèse chez les poissons qui ne sont pas reliés à la stéroïdogénèse ne sont cependant pas renseignés.

Les stéroïdes produits, principalement la 11 kétotestostérone (11-KT) chez les poissons, mais aussi la testostérone (T) et l'œstradiol (E<sub>2</sub>) agissent en retour sur les circuits neuroendocriniens pour contrôler la synthèse et la libération des gonadotropines pour revue, (Trudeau 1997; Zohar et al., 2010).



**Figure 9 :** contrôle des fonctions testiculaires (stéroïdogénèse et spermatogénèse) par l'axe hypothalamus –hypophyse – gonades (inspiré de (Schulz et al., 2010))  
esR = récepteur des œstrogènes; DHP = 17 $\alpha$ ,20  $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one



## V.2. Les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse. En effet, les données suggèrent que les hormones stéroïdiennes ont des rôles importants et distincts concernant le contrôle de la spermatogénèse chez les poissons. Par exemple, les androgènes (T et 11-KT) augmentent graduellement en même temps que la spermatogénèse progresse et diminuent lors de la spermiation.

### - Les œstrogènes

Les ERs sont exprimés dans les cellules testiculaires somatiques et les cellules germinales mâles haploïdes (Miura *et al.*, 1999), suggérant que l'E<sub>2</sub> joue un rôle important dans la régulation d'expression des gènes au sein des testicules. Par exemple, des travaux sur la truite ont montré que l'E<sub>2</sub> induit l'expression des gènes codant pour des protéines de liaison au rétinol, suggérant que l'E<sub>2</sub> contrôle l'homéostasie de l'acide rétinoïque au sein du testicule (Schulz *et al.*, 2010). L'acide rétinoïque est quant à lui nécessaire pour la prolifération et la différenciation des spermatogonies non différenciées chez les souris (Zhou *et al.*, 2008). C'est moins clair pour le poisson zèbre (Alsop *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'E<sub>2</sub> joue un rôle important dans le renouvellement et la prolifération des spermatogonies.

En effet, la mitose spermatogoniale peut être séparée en 2 catégories (régulées par différents mécanismes faisant intervenir les hormones stéroïdiennes):

(1) L'auto- renouvellement lent des spermatogonies

(2) La prolifération rapide des spermatogonies différenciées vers la méiose (Clermont 1972).

Chez les vertébrés, le renouvellement des spermatogonies est régulé par l'E<sub>2</sub>. Chez les poissons téléostéens, des approches *in vivo* et *in vitro* (Miura *et al.*, 1999; Amer *et al.*, 2001; Song and Gutzeit 2003) ont montré que l'E<sub>2</sub> est aussi une « hormone mâle », et joue un rôle important dans le renouvellement des spermatogonies SCC (*spermatogonial stem cells*). De plus, chez les femelles, la prolifération des gonies est également régulée par l'E<sub>2</sub> (Miura *et al.*, 2007). L'E<sub>2</sub> agit sur les cellules de Sertoli qui vont en réponse induire l'expression de facteurs de renouvellement des spermatogonies SCC (*spermatogonial stem cells*) (par exemple eSRS34 chez l'anguille, (Miura *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2007); et peut être FgB et FgC chez la daurade (Pinto *et al.*, 2006).

- Les androgènes :

Les AR ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont exprimés dans les cellules de Sertoli et les cellules intersticielles mais pas dans les cellules germinales, suggérant que les androgènes développent leurs activités biologiques via les cellules somatiques (Ikeuchi *et al.*, 2001). Les androgènes influencent l'expression testiculaire de nombreux gènes, comme ceux des cellules de Sertoli, où des gènes régulent la spermatogenèse et la stéroïdogenèse, comme démontré chez la truite pré pubère (Le Gac *et al.*, 2008). Par exemple, le gène *amh* qui inhibe la différenciation des spermatogonies est significativement inhibé par T et 11-KT. Il a également été montré que la T et la 11-KT pouvaient avoir des rôles distincts (régulation différentielle de certains gènes). Les androgènes supportent soit le processus entier de la spermatogenèse, ou au moins des étapes, comme la multiplication spermatogoniale et la formation et ou la maturation des spermatocytes (Remacle *et al.*, 1976). Les androgènes induisent la spermiation chez certaines espèces mais de manière moins efficace que la progestine (Ueda *et al.*, 1985).

### V.3. Les autres régulateurs de la stéroïdogenèse et de la spermatogénèse

#### V.3.1. Facteurs protéiques

S'il est admis que la régulation de la stéroïdogenèse passe essentiellement par l'axe HPG et les gonadotropines, il existe également d'autres régulateurs protéiques. Ce sont par exemple les protéines Dmrt1, Amh, Foxl2 ou encore Sox9. Elles jouent tout d'abord un rôle dans le développement et la différenciation sexuelle mais également au stade adulte, même si leurs rôles ne sont pas toujours bien définis chez le poisson.

Concernant Foxl2 des études récentes ont permis de montrer un rôle important de cette protéine dans la régulation de *cyp19a* et /ou inversement chez les poissons femelles (Baron *et al.*, 2004; Vizziano *et al.*, 2007). FoxL2 est en effet capable d'activer la transcription de *cyp19a in vitro* de manière directe et/ou indirecte (Wang and Orban 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007).

Concernant l'hormone anti-müllérienne (Amh), c'est un répresseur connu de *cyp19a* dans les ovaires et les testicules chez les mammifères mais son effet chez les poissons est moins bien renseigné. Cependant, durant la période de différenciation testiculaire, l'expression de *cyp19a* diminue alors que celle d'*amh* augmente chez le poisson zèbre, en accord avec le

modèle de régulation proposé chez les mammifères. En revanche, dans les ovaires, les régulations semblent plus complexes et l'hormone antimüllérienne ne semble pas réguler l'expression de *cyp19a* (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005). Chez des poisson adultes, quelques études récentes ont mis en évidence la capacité de certaines substances (flutamide, éthyniloestradiol, oestradiol) à inhiber l'expression du gène *amh* (Filby *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2007) mais ces études restent rares.

Chez le poisson mâle, on connaît encore moins les mécanismes d'action de Sox9 qui semble être responsable de la différenciation mâle chez les mammifères (Vidal *et al.*, 2001). Toutefois, chez le medaka et le tilapia, la forme testiculaire de *sox9* ne semble pas être impliquée dans la différenciation histologique des gonades mais plutôt dans le développement des tubules testiculaires (Nakamoto *et al.*, 2005; Ijiri *et al.*, 2008). Chez des poissons téléostéens, comme par exemple le poisson zèbre, deux formes ont été identifiées, Sox9a et Sox9b (Chiang *et al.*, 2001). Chez le poisson zèbre, Sox9a est exprimé dans le testicule alors que Sox9b est exprimé dans l'ovaire au cours du développement. Une étude récente chez le poisson chat a également mis en avant le rôle de Sox9a dans la spermatogenèse, avec une augmentation de sa transcription au cours de la recrudescence testiculaire et une diminution pendant la phase de reproduction (Raghuveer and Senthilkumaran, 2010). Les mêmes auteurs émettent l'hypothèse que les gonadotropines pourraient stimuler l'expression de *sox9a*. Au vu de l'ensemble de leurs résultats, ils suggèrent un rôle plausible de Sox9 dans la stimulation du cycle testiculaire.

### V.3.2. Neurohormones et facteurs de croissance

D'autres hormones hypophysaires peuvent également agir sur la spermatogenèse testiculaire, comme l'hormone de croissance Gh (Singh *et al.*, 1988), dont la synthèse est stimulée par le GnRh (Klausen *et al.*, 2005). Un dialogue entre les axes de reproduction et de croissance peut se faire via les stéroïdes sexuels et le GnRh qui modulent le relargage de la Gh hypophysaire (Melamed *et al.*, 1995). De plus, chez le saumon Chinook, le début de la prolifération spermatogoniale coïncide avec des niveaux élevés de Fsh, d'androgènes et d'Igf-1 (Campbell *et al.*, 2003), un facteur de croissance relargué par le foie en réponse à la stimulation Gh. Igf1 peut également être produit dans d'autres tissus cibles, comme le testicule. Les transcrits d'Igf1 et de son récepteur ont aussi été détectés dans les cellules germinales et de Sertoli chez la truite (Le Gac *et al.*, 1996) et des preuves expérimentales supportent son rôle dans la prolifération et /ou la différenciation des spermatogonies (Loir and

Le Gac 1994; Vinas and Piferrer 2008). La Gh peut également modifier la prolifération des cellules germinales (Loir 1999) et elle est capable de stimuler la prolifération des spermatogonies indépendamment des stéroïdes et d'Igfl chez l'anguille japonaise (Miura et al., 2011).

Enfin, nous pouvant également évoquer un autre facteur de croissance chez le poisson : l'activine B, qui est un facteur connu pour réguler positivement la synthèse de Fsh chez les vertébrés (Nett *et al.*, 2002). Chez les poissons, l'activine B est sécrétée par les cellules de Sertoli et joue un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules germinales (Miura and Miura 2001). Sa transcription et sa translation sont toutes les deux stimulées par l'ajout de la 11-KT dans des modèles *in vitro* d'anguille (Miura *et al.*, 1995).

# **Objectifs de la thèse**

Les perturbateurs endocriniens sont présents dans le milieu aquatique et représentent un risque pour la santé des organismes et des populations. Parmi les PE, certains peuvent potentiellement avoir un impact sur la synthèse hormonale. Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique générale de l'étude des effets des PE sur la fonction gonadique des poissons et est organisé autour de la problématique suivante :

**Quel est l'impact des perturbateurs endocriniens, en particulier des fongicides azolés, sur la stéroïdogénèse testiculaire du poisson zèbre?**

Pour répondre à cette question, différentes études complémentaires ont été menées pour

- (1) Etudier l'impact du clotrimazole et de molécules modèles sur la stéroïdogénèse testiculaire en réalisant des expositions de poissons *in vivo* ou bien en utilisant un système de culture d'explants testiculaires *in vitro* ;
- (2) Caractériser le mécanisme d'action du clotrimazole sur la stéroïdogénèse *in vivo* en analysant un ensemble de gènes le long de l'axe hypophyse- gonade ;
- (3) Etudier les effets du clotrimazole sur la spermatogénèse en s'appuyant sur des mesures au niveau moléculaire et histologique. Il s'agissait aussi de s'interroger sur le lien entre une perturbation de la stéroïdogénèse et les conséquences potentielles sur la spermatogénèse.

L'objectif de ce travail de thèse vise dans un premier temps à apporter des informations nouvelles sur le mécanisme d'action d'une molécule peu étudiée, le clotrimazole, mais aussi à évaluer son impact sur la fonction de reproduction. Ce travail met également en avant une démarche expérimentale permettant de rendre compte d'une perturbation endocrinienne. Enfin, il soulève des questions sur la pertinence des paramètres biologiques mesurés dans le cadre plus général de l'évaluation des dangers des substances chimiques chez le poisson.

# **Choix biologiques et démarche expérimentale**

## I. Choix biologiques

### I.1. Modèle biologique : le poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un vertébré téléostéen appartenant à la famille des cyprinidés. C'est un poisson tropical vivant dans les eaux douces de certaines régions d'Inde et de Birmanie. Cette espèce, au stade adulte ou embryonnaire, a été historiquement utilisée en recherche fondamentale, notamment dans les domaines de la biologie du développement et de la génétique (Fishman 2001). Elle présente de nombreux avantages :

- Le poisson zèbre s'élève facilement, est de petite taille (4-5cm de long à l'âge adulte), et possède un cycle de vie court. Il atteint ainsi sa maturité sexuelle entre 75 et 100 jours (Laale 1977), ce qui permet son utilisation pour des études sur un cycle de vie entier. Les femelles présentent un cycle de reproduction continu et asynchrone, permettant d'avoir une production d'œufs continue au sein d'un élevage. De plus, le nombre d'œufs produits par femelle est important, ce qui permet de travailler sur des grands effectifs (Eaton and Farley 1974). Les œufs ont un chorion transparent et ne sont pas adhérents, facilitant ainsi l'observation du développement et des anomalies ;
- Son génome est presque entièrement séquencé; la banque de données permet donc d'avoir accès directement aux séquences des gènes d'intérêt ([www.zfin.org](http://www.zfin.org)), et l'étude des gènes et de leur expression en est facilitée. Dans le cadre de notre étude, c'est un avantage indéniable, notamment en ce qui concerne le « design » des primers des gènes ;
- Le poisson zèbre est également préconisé dans les tests réglementaires d'écotoxicité aquatique. Dans le contexte des PE, le poisson zèbre est une espèce considérée comme modèle pour étudier les cibles et leurs modes d'action (Segner 2009). Différents tests de criblage d'activité de molécules *in vivo* ont été mis en place chez le poisson et ont notamment fait l'objet de plusieurs lignes directrices OCDE. Il s'agit d' « Essai à court terme de reproduction des poissons » (OCDE 229) et « Essai de 21 jours sur les poissons » (OCDE 230). Plus spécifiquement, un test OCDE sur poisson zèbre, appelé « fish sexual development test » (FSDT) et prenant comme principaux paramètres mesurés la concentration en Vtg et le sexe ratio, a été proposé comme test pour la détection de PE. Outre son utilisation pour les PE, le poisson zèbre est considéré comme un modèle en toxicologie (Lele and Krone 1996) (Hill *et al.*, 2005; Sipes *et al.*, 2011) . En effet, en plus des avantages présentés ci-dessus, sa



physiologie ou encore son développement ont été étudiés de manière très précise en condition normale, mais ils ont également été étudiés pour rechercher les effets de différents types de toxicité, de la toxicité vasculaire à la perturbation endocrinienne. La bonne conservation des voies de signalisation et des processus de développement entre les poissons zèbres et les mammifères, ainsi que la concordance globale entre les études de toxicité sur le poisson zèbre et sur les mammifères montrent que cette espèce peut également être représentative des vertébrés supérieurs (Sipes et al., 2011).

Nous l'avons surtout choisi pour les connaissances acquises sur ce modèle au cours des études passées menées à l'INERIS. En effet, nous possédons un élevage autonome, permettant à tout moment de générer de nouveaux individus et d'avoir accès à des poissons adultes. L'élevage est divisé en 2 parties indépendantes, avec d'un côté un élevage de poisson zèbre classique de souche AB et d'un autre côté un élevage de poissons zèbres transgénique cyp19a1b-GFP. Le poisson zèbre a déjà été utilisé dans plusieurs études au sein de notre laboratoire et des outils spécifiques de mesures de paramètres biologiques sur ce modèle ont été mis au point. Ces outils ont été utilisés dans le cadre de l'étude de perturbations endocriniennes. Il s'agit par exemple (1) du développement d'anticorps spécifiques contre la vitellogénine (Vtg) (Brion *et al.*, 2002) (2) du développement d'anticorps dirigés contre des enzymes de la stéroïdogenèse (Cyp17a1a, Cyp11c1, Foxl2) ou encore (3) de l'utilisation de lignée transgénique cyp19a1b-GFP dans le but d'étudier les effets de composés œstrogéniques.





## I.2. Choix des molécules

Les molécules étudiées au cours de ce travail de thèse sont des fongicides pharmaceutiques ou pesticides de la famille des azoles ainsi que des molécules modèles qui viendront en appui comme témoins positifs ou témoins négatifs dans les différentes études.

### I.2.1. Les fongicides azolés

Les azoles étudiées au cours de ce travail sont présentés dans le **tableau 7** ci- dessous.

**Tableau 7** : Azoles fongicides utilisés au cours des expositions

Molécule	Classe	Fonction	Formule typologique	Masse molaire moléculaire (g/mol)	Log de Kow	Concentration <i>in vivo</i>	Concentration <i>ex vivo</i>
Clotrimazole (CLO)	Imidazole	Pharmaceutique anti-fongique		344,8	4,1	0,09 – 1,45 $\mu\text{M}$ 30 – 500 $\mu\text{g/L}$	<b>0,2 – 5 <math>\mu\text{M}</math></b> 69 – 1724 $\mu\text{g/L}$
Kétoconazole (KTC)	Imidazole	Pharmaceutique anti-fongique		531,4	4,45	/	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b> 531,4 $\mu\text{g/L}$
Propiconazole (PPI)	Triazole	Pesticide anti-fongique		342,2	3,7	/	<b>0,2 – 5 <math>\mu\text{M}</math></b> 68 – 1711 $\mu\text{g/L}$
Fenbuconazole (FBU)	Imidazole	Pharmaceutique anti-fongique		336,8	/	/	<b>0,2 – 5 <math>\mu\text{M}</math></b> 67 – 1684 $\mu\text{g/L}$

Les concentrations en azoles ont été choisies dans le but de mettre en lumière des mécanismes d'action et ne sont pas basées sur des concentrations « environnementales ». Elles sont comparables aux concentrations utilisées dans des études portant sur des expositions à d'autres azoles (par exemple (Zhang *et al.*, 2008a; Ankley *et al.*, 2009)) et ont également été sélectionnées par rapport à des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire sur le clotrimazole. Notre attention s'est d'ailleurs portée sur cet azole car il a la capacité d'inhiber l'activité aromatasase dans des fractions microsomales de cerveau ou d'ovaires chez le poisson (Monod *et al.*, 1993; Hinfray *et al.*, 2006). Le clotrimazole peut également inhiber l'activité du Cyp17 *in vitro* chez des modèles mammaliens (Ayub *et al.*, 1987).

Un chapitre a été consacré aux azoles dans la partie synthèse bibliographique (*cf* chapitre synthèse bibliographique, paragraphe 2.).

### 1.2.2. L'éthinylœstradiol

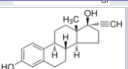

Le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE<sub>2</sub>) est une hormone stéroïde de synthèse utilisée principalement dans les contraceptifs hormonaux. *In vitro*, l'EE<sub>2</sub> est plus puissant que l'œstradiol pour activer les récepteurs des œstrogènes dans différents modèles cellulaires mammifères et poissons (par exemple (Legler *et al.*, 2002; Cosnefroy *et al.*, 2009)) et *in vivo*, des travaux ont montré les effets néfastes de faibles concentrations d'EE<sub>2</sub> sur le développement et la reproduction des poissons (Segner *et al.*, 2003; Nash *et al.*, 2004). Récemment, des travaux chez le poisson zèbre ont montré la capacité de l'EE<sub>2</sub> à inhiber l'expression de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse *in vivo* et *ex vivo*, mais également à perturber la spermatogénèse (de Waal *et al.*, 2009). Dans le cadre de nos travaux, nous avons donc choisi cette molécule comme témoin négatif pour sa capacité à inhiber l'expression des

gènes de la stéroïdogénèse, mais aussi pour sa capacité à inhiber la spermatogénèse (**tableau 8**).

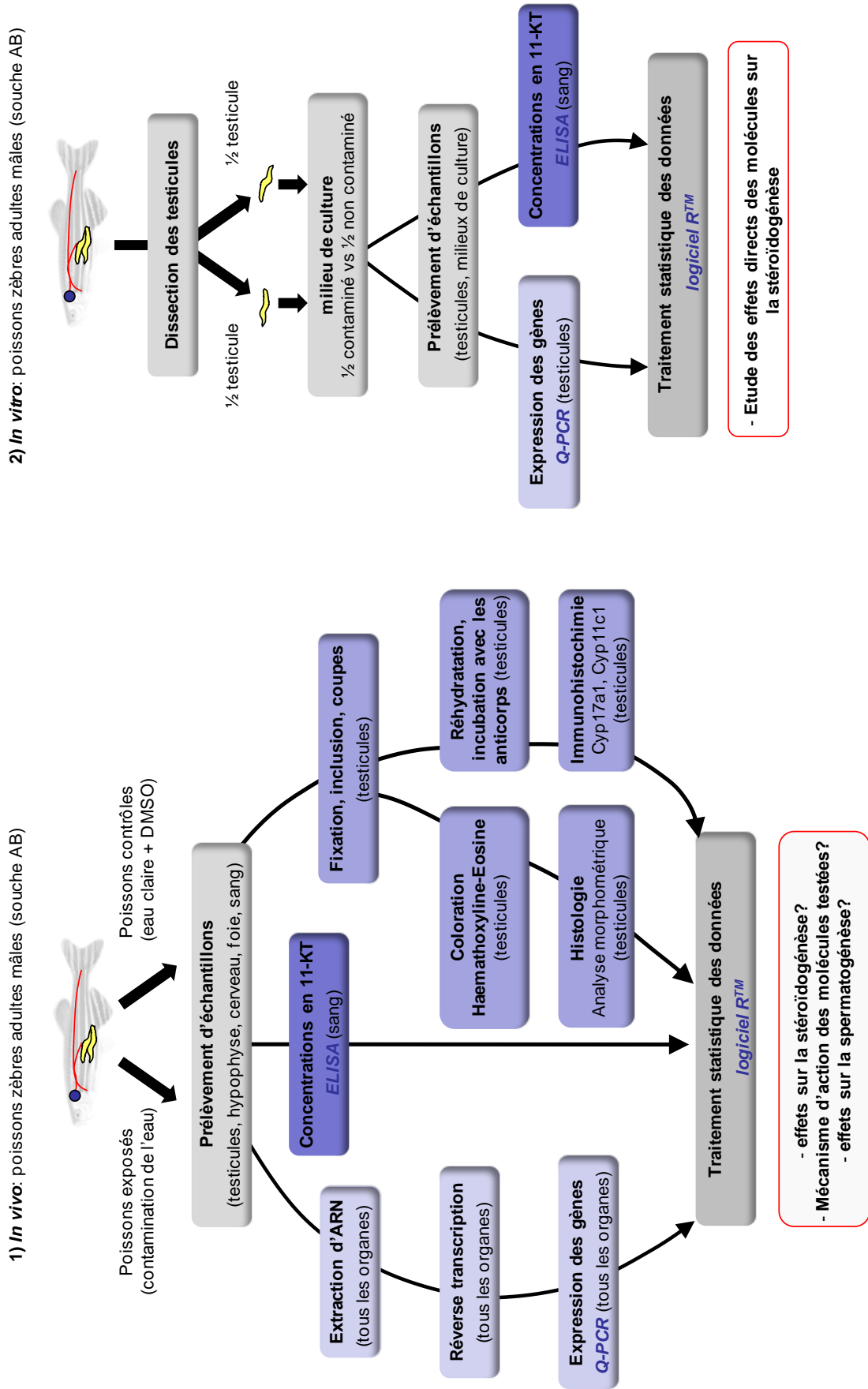
### I.2.3. La forskoline

A l’opposé, la forskoline (FSK) est un activateur de la voie AMPc par stimulation de l’adényl cyclase, et elle induit l’expression des gènes de la stéroïdogénèse. Nous nous sommes donc intéressé à cette molécule car elle permet d’augmenter de manière globale la stéroïdogénèse, de l’expression des gènes de la voie de synthèse jusqu’à la production de stéroïdes (Leal *et al.*, 2009). L’induction de ces niveaux basaux est intéressante *in vitro* pour détecter de manière plus sensible l’effet de molécules ayant pour propriété l’inhibition de certaines activités enzymatiques de la stéroïdogénèse, ce qui est le cas des azoles.

**Tableau 8** : Molécules contrôles utilisées au cours des expositions

Molécule	Classe	Fonction	Formule typologique	Masse molaire moléculaire (g/mol)	Log de Kow	Concentration <i>in vivo</i>	Concentration <i>ex vivo</i>
Ethynil œstradiol (EE <sub>2</sub> )	/	Agoniste du ER		296,4	3,67	1 nM <b>0,30 µg/L</b>	<b>1 nM</b> 0,30 µg/L
Forskoline (FSK)	/	Activateur de la voie AMPc		410,5	/	/	<b>1 µM</b> 410,5 µg/L

**Figure 10** : schéma de la démarche expérimentale générale



## II. Expositions

La démarche expérimentale générale est présentée dans la **figure 10**. Comme indiqué sur le schéma, des expositions *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées. Ces deux types d'exposition avaient déjà été mis en place au laboratoire et ont été volontairement utilisés de manière complémentaire.

### II.1. Expositions *in vivo*

Des poissons zèbres adultes mâles ont été exposés *in vivo* pendant 7 ou 21 jours au clotrimazole (**tableau 6**). Concernant la voie d'exposition, nous aurions pu choisir une contamination par la nourriture, car les azoles tendent à s'adsorber sur les particules en suspension (OSPAR 2005), ou encore la contamination par les sédiments. Nous avons finalement choisi une contamination par l'eau, plus aisée à mettre en œuvre, déjà pratiquée au sein du laboratoire et permettant des prélèvements d'échantillons d'eau rapide afin de réaliser une quantification du clotrimazole en chimie analytique avec une étape de purification sur colonne.

Les poissons ont été exposés dans des aquariums de 4 L en conditions semi-statiques (25°C). Pour limiter le stress, nous avons choisi de limiter leur nombre à 10 par aquarium. Un renouvellement de l'eau a été effectué toutes les 24h et, au moment de chaque changement d'eau, une nouvelle dose de clotrimazole a été ajoutée. Pour cela, une solution mère de clotrimazole a préalablement été préparée dans du DMSO (0,004% V/V) alors que du DMSO seul a été ajouté dans les aquariums témoins (0,004% V/V). Nous avons choisi ce solvant car les composés organiques s'y dissolvent bien, et que des études au sein de notre laboratoire ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre des poissons mis en présence de DMSO ou en stabulation dans de l'eau claire pour des mesures d'activités d'enzymes de la stéroïdogénèse par exemple (données non montrées). De plus, il est admis que ce solvant est peu toxique à de faibles concentrations. Des études rapportent quand même que le DMSO peut avoir une activité œstrogénique à des concentrations fortes. Par exemple, le DMSO induit l'expression des gènes codant pour des récepteurs aux œstrogènes mais aussi leur synthèse protéique dans des cultures primaires d'hépatocytes exposées à du DMSO 0,1% V/V

(Mortensen *et al.*, 2006). Cependant, les concentrations utilisées dans notre étude sont bien plus faibles.

#### *II.1.1. Contrôle de l'exposition*

Les conditions d'exposition ont été contrôlées quotidiennement avec un suivi de la physico-chimie de l'eau (T°C, pH, conductivité, concentration en oxygène dissous).

De plus, les concentrations en clotrimazole ont été déterminées à 3 points d'échantillonnage au cours de chaque exposition, en prélevant en parallèle un échantillon d'eau avant le renouvellement (24h après l'exposition) et juste après le renouvellement (0h). Brièvement, les échantillons d'eau ont été purifiés et concentrés sur colonne SPE (« Solid Phase Extraction »). La concentration en clotrimazole a ensuite été déterminée par HPLC à l'aide d'une gamme de standards. Cette méthodologie, détaillée dans les articles, a été adaptée d'une méthodologie déjà mise en place (Peschka *et al.*, 2007).

#### *II.1.2. Prélèvement des échantillons biologiques*

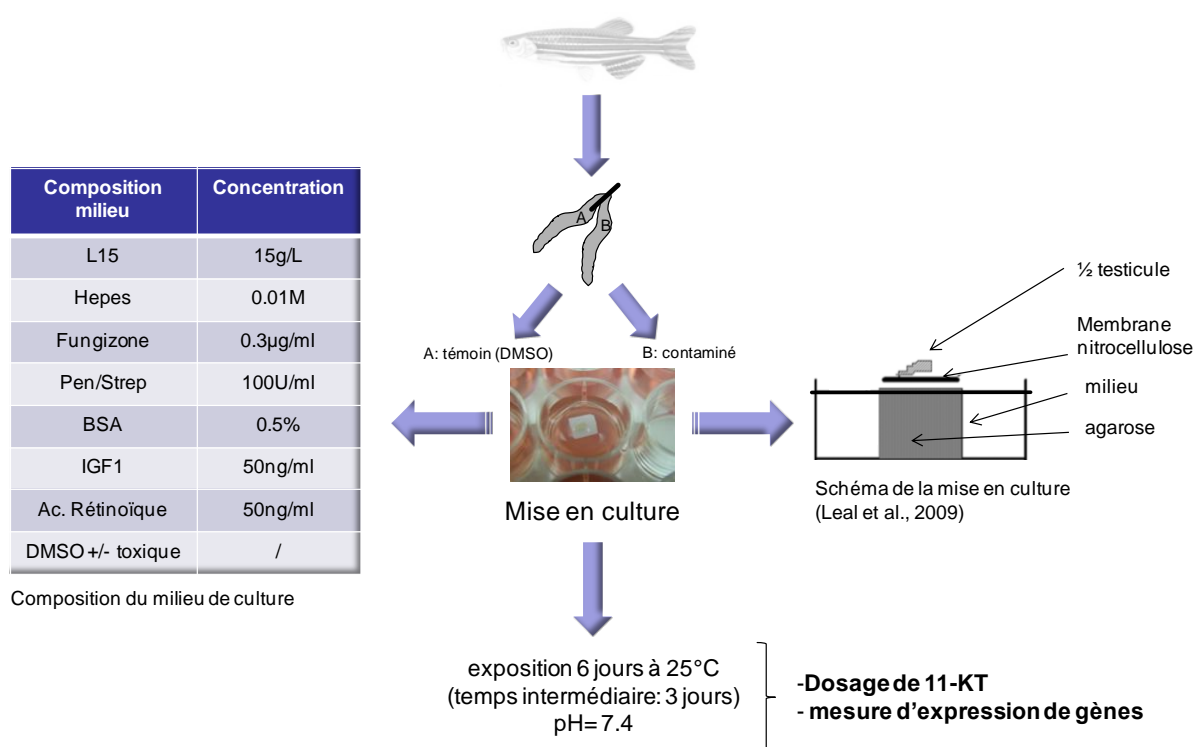
A la fin des expositions, les poissons ont été sacrifiés dans de l'eau refroidie. Cette technique de sacrifice est spécifique des espèces d'eau chaude. Les organes suivants ont ensuite été prélevés, avec quelques différences selon que l'exposition ait été réalisée à 7 ou à 21 jours : (1) les testicules, le foie, le cerveau et l'hypophyse, qui ont été conservés dans du RNA later à – 20 °C pour pouvoir réaliser des mesures d'expression de gènes, et (2) le sang, qui a été mis dans une solution de PBS hépariné et congelé à – 20 °C dans l'attente de la quantification en stéroïdes circulants (11-KT). Une partie des testicules a été fixée dans du Bouin en vue d'analyses histologiques ou immunohistochimiques. La mesure des paramètres biologiques est présentée dans le paragraphe III.

## II.2. Expositions *in vitro*

Nous avons choisi d'étudier l'effet de fongicides azolés et de molécules contrôles (FSK et EE<sub>2</sub>) sur un modèle de culture d'explants testiculaires *in vitro*. Ce modèle a été initialement développé chez l'anguille (Miura *et al.*, 1991) et récemment adapté au poisson zèbre (Leal *et al.*, 2009). A l'origine, ce modèle a été développé pour étudier la spermatogenèse. Dans notre étude, il a été utilisé en parallèle de l'*in vivo* pour étudier le mécanisme d'action du clotrimazole, le but étant de détacher l'explant testiculaire des régulations de l'organisme. Il a également été question d'étudier l'effet d'autres fongicides azolés et de molécules contrôles, connus pour stimuler ou inhiber la stéroïdogénèse *in vitro*.

### II.2.1. Méthode de mise en culture des explants testiculaires

Le principe de la mise en culture est présenté dans la **figure 11** ci-dessous :



**Figure 11:** Schéma du système *in vitro* de culture d'explants testiculaires de zebrafish

Très brièvement, pour chaque individu, les testicules ont été disséqués, séparés en deux et mis en culture en parallèle. La composition du milieu de culture est indiquée dans la **figure 11**. Ainsi, chaque testicule exposé sera associé à « son » testicule contrôle, permettant

un appariement des échantillons pour le traitement statistique des données. Les auteurs qui ont mis en place ce système de culture ont confirmé que pour les deux testicules d'un même individu sont similaires (1) les compositions cellulaires (2) les niveaux d'ARNm de marqueurs de cellules germinales et de gènes spécifiques des cellules somatiques et (3) les niveaux de sécrétion/libération de 11-KT (Leal et al., 2009). Ces auteurs ont également montré que ce système de culture a la capacité de maintenir le processus de la spermatogenèse pendant 6 jours et que la FSK peut stimuler la sécrétion/libération de 11-KT dans le milieu de culture.

A ce niveau, il convient de remarquer que le milieu de culture contient de la fungizone (amphotéricin B), qui agit par perméabilisation de la membrane en se liant au cholestérol et à ses esters. Même si le mécanisme d'action est ici différent des azoles, cet élément est à prendre en compte puisque la fungizone peut potentiellement perturber les réponses biologiques basales.

Par ailleurs, au niveau du vocabulaire employé, il y a une divergence entre l'article rédigé en anglais (chapitre 1 des résultats) et le manuscrit de thèse : pour parler de culture d'explant testiculaire, le terme *ex vivo* est utilisé dans l'article 1 alors que le terme *in vitro* semble ici plus approprié. En effet, la culture *ex vivo* est un terme utilisé lorsque l'on isole un organe pour réaliser des mesures directement sur celui là, après avoir par exemple exposé des individus *in vivo* (Leal et al., 2009; Ankley *et al.*, 2012). En revanche, si l'on expose des organes indépendamment de l'organisme entier, on parlera de culture *in vitro*. Le terme *ex vivo* utilisé dans l'article 1, qui est également le terme employé dans la publication d'origine qui décrit le système de culture d'explants testiculaires chez le poisson zèbre (Leal et al., 2009), ne sera donc pas employé dans le manuscrit de thèse en français.

### II.2.2. Exposition et traitement des explants testiculaires

Les explants testiculaires ont été contaminés 3 ou 6 jours avec de l'EE<sub>2</sub> ou des azoles (**Tableau 7**). Dans le cas des contaminations aux azoles, des co-traitements avec la FSK ont également été réalisées (en comparaison de témoins traités uniquement par FSK) pour augmenter les niveaux de base de 11-KT. A la fin des expositions, les testicules ont été préservés dans du RNA later en attendant les analyses d'expression de gènes. Les milieux de culture ont également été conservés afin de mesurer la concentration en 11-KT (**Figure 11**).



Le paragraphe suivant fait état des paramètres biologiques mesurés après les différentes expositions.

### III. Mesures des paramètres biologiques

Suite aux expositions réalisées *in vivo* et *in vitro*, un ensemble cohérent de paramètres biologiques a été étudié. Les paramètres biologiques choisis vont être relativement différents en fonction du modèle d'exposition mais également en fonction de la durée d'exposition (*in vivo* ou *in vitro*, 7 ou 21 jours).

Cependant, la philosophie est restée la même : nous avons toujours cherché à coupler des mesures d'expression de gènes, notamment ceux impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse à des mesures rendant compte d'une synthèse protéique en aval de la stéroïdogénèse, comme la mesure de la concentration en 11-KT. Pour les expositions *in vivo*, les paramètres biologiques mesurés sont cependant plus étendus comparativement à l'*in vitro*. En effet, le réseau de gène a été renforcé, avec la prise en compte d'autres cibles majeures, qui sont des nœuds de régulation le long de l'axe hypothalamus hypophyse gonades (HPG) dans son ensemble. Par ailleurs, des analyses histologiques ont également été réalisées afin de savoir si des effets observés au niveau moléculaire pouvaient se traduire par des effets au niveau tissulaire.

#### III.1. Mesure d'expression de gènes

##### III.1.1. Choix des gènes cibles

Nous avons choisi de mesurer les variations d'expression d'un réseau de gènes fonctionnels exprimés dans différents organes et ayant un rôle direct ou indirect le long de l'axe HPG, mais également ayant un rôle plus apical dans la fonction de reproduction.

- Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes codant pour des enzymes ou des protéines de transport (*star*) impliquées dans le processus de la stéroïdogénèse (**tableau 9**).

**Tableau 9** : caractéristique des gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse utilisés au cours de l'étude

Nom	Nom développé	fonction de la protéine	séquence du primer sens (5' → 3')	séquence du primer anti- sens (5' → 3')	numéro d'accès
<i>star</i>	steroidogenic acute regulatory protein	Stéroïdogénèse	ACCTGTTTTCT GGCTGGGATG	GGGTCCATTCT CAGCCCTTAC	NM_131663
<i>hsd3b1</i>	hydroxyl- $\Delta$ -5-steroid dehydrogenase, 3 $\beta$ - and steroid $\Delta$ -isomerase 1	Stéroïdogénèse	GCAACTCTGGT TTTCCACACTG	CAGCAGGAGC CGTGTAGCTT	NM_212797.1
<i>cyp17a1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily A polypeptide 1	Stéroïdogénèse	GGGAGGCCA CGGACTGTTA	CCATGTGGAAC GTAGTCAGCAA	NM_212806.3
<i>cyp11c1</i>	cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1	Stéroïdogénèse	GCTCATGCAC ATTCTGAGGA	TGTGCTGAAG GTGATTCTCG	DQ650710.1
<i>hsd11b3a</i>	hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 3a	Stéroïdogénèse	TGGTGAAGTA TGCCATCGAA	AGTAGCCATC GTGTGTGCTG	AY578180
<i>cyp19a1a</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a	Stéroïdogénèse	CTGAAAGGGC TCAGGACAA	TGGTCGATGG TGTCTGATG	AF_226620

Afin d'aller plus loin dans l'étude du mécanisme d'action du clotrimazole, des gènes impliqués dans l'axe hypophyse- gonades ont par la suite été étudiés *in vivo*, à savoir les gonadotropines au niveau hypophysaire et leurs récepteurs au niveau testiculaire. Il a également été question de mesurer l'expression de gènes au niveau du cerveau. En effet, nous nous sommes intéressés à l'expression du *gnrh3*, régulateur clef de l'axe HPG, mais également à l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse cérébrale, comme par exemple l'aromatase b (*cyp19a1b*). Les transcrits des récepteurs aux œstrogènes ont également été quantifiés. Ces gènes sont présentés dans le **tableau 10**, la stéroïdogénèse cérébrale faisant intervenir les mêmes enzymes qu'au niveau gonadique. A noter que l'aromatase « cérébrale » *cyp19a1b* est également exprimée, de manière moindre, dans les gonades et inversement ; l'aromatase *cyp19a1a* dite « gonadique » étant également plus faiblement exprimée au niveau du cerveau.

**Tableau 10** : caractéristique des gènes impliqués directement ou indirectement dans la régulation de l'axe HPG

Nom	Nom développé	fonction de la protéine	séquence du primer sens (5' --> 3')	séquence du primer anti- sens (5' --> 3')	numéro d'accès
<i>lhβ</i>	luteinizing hormoneβ sub unit	contrôle de la stéroïdogénèse	GCAGAGACACT TACAACAGCC	AAAACCAAGCT CTGAGCAGCC	NM_205622.2
<i>fshβ</i>	follicle stimulating hormoneβ sub unit	contrôle stéroïdogénèse /spermatogénèse	CAGATGAGG ATGCGTGTGC	ACCCCTGCA GGACAGCC	NM_205624.1
<i>lhgr</i>	luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor	récepteur à la Lh	ATCACTCACG CTCTCCGACT	GCTGCTGACG CCTATTAAGG	NM_205625.1
<i>fshr</i>	follicle stimulating hormone receptor	récepteur à la Fsh	GAGGATTCCCAG TAATGCTTTCCT	TCTATCTCACGA ATCCCGTTCTTC	NM_001001812.1
<i>gnrh3</i>	gonadotropin-releasing hormones 3	contrôle de la synthèse /libération des gonadotropines	AAATGGAGGC AACATTCAGG	CCTTCAGCATC CACCTCATT	NM_182887.2
<i>gnrhr1</i>	gonadotropin-releasing hormone receptor 1	récepteur de la GnRH 1	GTGGCTTCAT TTGTGGTGTG	CCAGAGATTTTC GGAGAGCAG	NM_001144980
<i>gnrhr2</i>	gonadotropin-releasing hormones receptor 2	récepteur de la GnRH 2	CTTGGCCTGT GGTACTGGTT	GACGTCCTGAT GGAGGTCAT	NM_001144979
<i>gnrhr4</i>	gonadotropin-releasing hormones receptor 4	récepteur de la GnRH 4	AAACACACGC TTTCGCTCTT	AGGTTGCACA CAGCTGACAC	NM_001098193
<i>cyp19a1b</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1b	Stéroïdogénèse	ACTAAGCAAGTCC TCCGCTGTGTACC	TTTAAACATACCTA TGCATTGCAGACC	NM_131642.1
<i>esr1</i>	estrogen receptor α	récepteur aux œstrogènes	GGAGATGCT GGACGCTCA	GCTGCAGCTC CTCCTCTTGG	NM_152959.1
<i>esr2a</i>	estrogen receptor β2	récepteur aux œstrogènes	TGATCCTGCTCA ACTCTAATAAC	TCCAGCAGATTC AGCACCTTCCC	NM_174862.3
<i>esr2b</i>	estrogen receptor β1	récepteur aux œstrogènes	TGATCCTCCTG AACTCCAACA	TCCAGCAGACAC AGCAGCTTGGA	NM_180966.2

L'expression d'autres gènes testiculaires, ayant un rôle direct dans la spermatogénèse, a été étudiée pour voir si les variations au niveau de l'axe HPG se traduisaient par des modifications moléculaires au niveau de cette fonction (**tableau 11**). L'étude de l'expression de ces gènes a été réalisée en parallèle à l'histologie des gonades.

**Tableau 11** : caractéristique des gènes impliqués directement dans la spermatogenèse

Nom	Nom développé	fonction de la protéine	séquence du primer sens (5' --> 3')	séquence du primer anti- sens (5' --> 3')	numéro d'accès
<i>ar</i>	androgen receptor	récepteur aux androgènes (T, 11-KT)	ACGTGCCTG GCGTGAAAA	CAAACCTGCC ATCCGTGAAC	NM_001083123.1
<i>amh</i>	anti-müllerian hormone	hormone, régression des canaux de Müller	CTCTGACCTTGAT GAGCCTCATT	GGATGTCCCTTAA GAACCTTTGCA	NM_001007779.1
<i>igf3</i>	insulin-like growth factor 3	facteurs de croissance localisation sertolienne,	GTGCTGCGT TCTCATCCT	TGTTGAGGA GGTTTGGGT	NM_001115050
<i>piwil1</i>	piwi-like 1	marqueur des spermatogonies.	CAAAATGGGA GGAGAGCTGTG	CAAAGAATCGG GAGCTGATGC	NM_183338.1

Enfin, les niveaux de transcrits de gènes codant pour des enzymes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques ont été quantifiés. Ces enzymes interviennent également dans le métabolisme des stéroïdes sexuels, à savoir le catabolisme. Elles peuvent donc influencer sur la concentration finale en stéroïdes sexuels, qui est la somme de leur synthèse, de leur libération, de leur dégradation et de leur excrétion. De plus, ces enzymes sont des CYPs, ce qui en fait des cibles potentielles des azoles. En effet, leur activité ainsi que leur expression peuvent potentiellement être modifiées par une exposition à des fongicides azolés chez les poissons (Miranda *et al.*, 1998). Ces gènes sont présentés dans le **tableau 12**.

**Tableau 12** : caractéristique des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques

Nom	Nom développé	fonction de la protéine	séquence du primer sens (5' --> 3')	séquence du primer anti- sens (5' --> 3')	numéro d'accès
<i>cyp1a1</i>	cytochrome P450 1A1	métabolisation des xénobiotiques (enzyme de phase I)	GACAGGCGCT CCTAAACAG	CTGAACGCCA GACTCTTCC	NM_131879.1
<i>cyp3a65</i>	cytochrome P450 3a65	métabolisation des xénobiotiques (enzyme de phase I)	CGGTGCGTAC AGTATGGATG	AGAGAGGGTT CAGCAGGTCA	NM_001037438.1
<i>gstal</i>	glutathion S transférase, sous unité $\alpha$ 1	métabolisation des xénobiotiques (enzyme de phase II)	CGCAGGAAAAT ACAACCTCTATG	AGCTTCCAGAAG ATGAACATCAG	NM_213394.1
<i>gstp1</i>	glutathion S transférase, sous unité $\beta$ 1	métabolisation des xénobiotiques (enzyme de phase II)	CAGTTGCCTAAA TTTGAAGATGG	AGCTTCCAGAAG ATGAACATCAG	NM_131734.3

### III.1.2. Méthode de quantification des gènes

Les gènes ont été quantifiés par PCR quantitative (« Polymerase Chain Reaction »). Brièvement, l'ARN total a été extrait des différents organes (gonades, hypophyses, cerveaux, foie) en utilisant le Trizol<sup>®</sup>. Après vérification de la qualité des ARN totaux par une migration sur gel d'agarose, une quantification et une normalisation de la concentration en ARN total ont été réalisées. Les échantillons ont ensuite fait l'objet d'une transcription inverse pour obtenir de l'ADN complémentaire à l'ARN (ADNc).

Pour chaque gène cible (**tableaux 9-12**), deux couples de primer ont été conçus et des mises au point ont été réalisées sur des échantillons témoins pour évaluer la spécificité des amorces et leur qualité. Pour cela, une PCR classique suivie d'une migration sur gel d'agarose a permis de valider la spécificité d'un couple de primer (un seul amplicon) et la taille de l'amplicon. Ensuite, des essais préliminaires de PCR quantitative ont été réalisés sur des échantillons témoins pour chaque couple d'amorces, afin d'évaluer leur influence sur l'efficacité de la réaction de PCR. Un autre paramètre, qui est la concentration en amorces a également été testé. Ces tests ont permis de valider un couple d'amorces pour chaque gène cible.

Enfin, la PCR quantitative a été réalisée sur les ADNc pour chaque gène cible. Pour résumer le principe, la PCR quantitative consiste, comme la PCR classique, à amplifier un brin d'ADNc, spécifique d'un gène, à l'aide d'un couple d'amorces. Pour cela, on réalise des cycles de PCR, grâce à un thermocycleur, qui sont caractérisés par trois étapes correspondant à trois températures spécifiques (1) la dissociation des ADNc « double brin » (2) l'hybridation des amorces et (3) l'élongation de l'amplicon d'intérêt grâce à l'enzyme polymérase. Pour la PCR quantitative, un composé se fixant sur les acides nucléiques et émettant de la fluorescence est utilisé. Dans notre cas, il s'agit du SYBR Green<sup>®</sup>. A chaque cycle, contrairement à la PCR classique, la fluorescence est donc mesurée et augmente au cycle  $n+1$  puisqu'en théorie, à chaque cycle, il y a 2 fois plus d'acides nucléiques. Au bout de  $n$  cycles, la fluorescence dépasse un seuil de détection. Plus l'ADNc est concentré, plus son cycle de sortie, appelé Ct (« Cycle threshold ») est bas.

### III.1.3. Expression des résultats « gènes »

A ce niveau, il convient de noter qu'une quantification absolue de l'expression des gènes a été choisie *in vivo*. En effet, il avait tout d'abord été envisagé de réaliser une

quantification relative en utilisant un gène de ménage (également appelé gène de référence). Le *gapdh*, l'*elf1a*, ou la  $\beta$ -actine ont alors été utilisés. Aucune de leur expression n'est apparue stable en fonction du traitement, en accord avec certaines des conclusions d'autres auteurs (McCurley and Callard 2008). Une solution alternative a donc été envisagée : les ARN totaux, préalablement ajustés à une même concentration avant la RT, ont été utilisés pour normaliser les échantillons. De plus, nous nous sommes appuyés sur une gamme de standards pour chaque gène d'intérêt ( $10^{-4} - 10^{-11}$  µg/µl), ce qui nous a permis d'obtenir une efficacité réelle de PCR. Une valeur de « Ct » a alors été associée à une concentration en µg/µl pour chaque échantillon. Cette méthode a été décrite plusieurs fois dans la littérature (Huggett *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2007a). Une autre alternative aurait été d'utiliser les trois gènes de référence et de faire une moyenne géométrique des 3 valeurs. Cette méthode n'a pas été retenue car la variabilité observée en fonction du traitement semblait trop élevée *in vivo*.

Pour les mesures au sein des explants testiculaires (*in vitro*), une quantification relative, en utilisant comme gène de référence la *gapdh*, a été utilisée, car la variabilité était moins élevée et les résultats obtenus en absolu ainsi qu'en relatif étaient comparables. L'expression des résultats sous forme de facteur d'induction (FI) pour l'expression des gènes *in vitro* correspond à la formule suivante :

$$FI = \frac{([gène\ cible] \text{ en } \mu g/\mu l \text{ estimé à partir de la courbe standard en fonction du nombre} \\ \text{« Ct » du gène cible dans le testicule traité}) / (ARN\ total \text{ en } \mu g/\mu l \text{ du testicule traité})}{([gène\ cible] \text{ en } \mu g/\mu l \text{ estimé à partir de la courbe standard en fonction du nombre} \\ \text{« Ct » du gène cible dans le testicule contra-latéral non traité}) / (ARN\ total \text{ en } \mu g/\mu l \text{ dans le} \\ \text{testicule contra-latéral non traité})}$$

### III.2. Immunohistochimie et dosage de 11-KT

Le point de départ de notre étude est la stéroïdogénèse. Nous avons donc choisi d'étudier l'expression de gènes impliqués dans ce processus. Afin de savoir si les effets observés au niveau transcriptionnel étaient suivis par des effets au niveau traductionnel, il nous est apparu logique d'examiner la synthèse protéique des enzymes de la stéroïdogénèse. De la même manière, nous avons regardé les concentrations d'un des produits finals de la stéroïdogénèse : la 11-kétotestostérone.

### *III.2.1. Immunohistochimie par fluorescence*

Nous disposons au laboratoire de deux anticorps dirigés contre le Cyp17a1 et le Cyp11c1. Pour le Cyp17a1, il s'agit d'un anticorps primaire de lapin dirigé contre un peptide du Cyp17a1 de poisson zèbre alors que pour le Cyp11c1, c'est un anticorps primaire de rat dirigé contre un peptide de truite. Cet anticorps, fourni par Yann Guiguen (INRA de Rennes), fonctionne également chez le poisson zèbre. Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permet ensuite la révélation.

Après l'exposition, les testicules ont été conservés dans du Bouin. Ils ont ensuite été déshydratés dans de l'éthanol, lavés dans du toluène et enrobés dans de la paraffine. Les échantillons ont alors été coupés finement (section longitudinale de 5µm) et montés sur des lames.

Le marquage des protéines Cyp17a1 et Cyp11c1 a été réalisé par immunohistochimie fluorescente avec les anticorps mentionnés ci-dessus, en utilisant les lames de 4 à 5 individus par condition.

### *III.2.2. Dosage de la 11-KT*

La 11-KT est un androgène jouant un rôle clef dans la physiologie de la reproduction chez les poissons téléostéens. Il est principalement synthétisé dans les cellules de Leydig par la stéroïdogénèse, à partir de l'adrénostérone ou de la 17β-hydroxytestostérone. Il a été dosé par un ELISA très spécifique de la 11-KT (kit 11-KT EIA®) :

Ce dosage est basé sur le principe de l'ELISA compétitif avec un anticorps secondaire liés à l'Acétylcholinestérase (la 11-KT est lié à AChE). La 11-KT liée à l'AChE entre en compétition avec la 11-KT naturelle pour les sites de fixation de l'anticorps primaire anti-11-KT qui est coaté (fixé) aux puits réactionnels. Un substrat est ensuite ajouté (réactif de Ellman), permettant de colorer la solution. L'absorbance, lue au spectrophotomètre à 412 nm, est inversement proportionnelle à la quantité de 11-KT naturelle (plus il y a de 11-KT naturelle, moins il y a de sites libres pour la 11-KT liés à l'AChE).

### III.3. Analyse morphométrique de la spermatogenèse

Après avoir mesuré les différents paramètres mentionnés ci-dessus, du gène à la protéine, nous avons choisi d'étudier l'histologie des gonades pour mettre à l'épreuve le lien entre des événements se déroulant au niveau moléculaire et des événements se déroulant au niveau tissulaire, en rapport direct la fonction de reproduction. Nous nous sommes donc tournés vers une analyse morphométrique des différents types cellulaires de la gonade, en portant notre attention sur les cellules germinales et les cellules somatiques, à savoir les cellules de Sertoli et les cellules interstitielles (les cellules de Leydig).

La méthode qui a été utilisée est adaptée d'un protocole récemment développé chez le poisson zèbre adulte mâle (Feitsma *et al.*, 2007; de Waal *et al.*, 2008), même si quelques modifications mineures ont été apportées. Le point de départ de cette méthode est de déterminer l'abondance relative de chaque type cellulaire dans les testicules, à savoir les spermatogonies A, les spermatogonies B, les spermatocytes, les spermatides, les spermatozoïdes et d'autres types cellulaires.

Afin d'obtenir une abondance relative de ces différents types cellulaires, nous avons utilisé des coupes de testicules, mais contrairement aux expérimentations d'immunohistochimie, elles ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Nous avons ensuite réalisé des clichés en microscopie (x400) qui ont été intégrés à un logiciel afin de superposer une grille d'intersection de 352 points. Huit champs ont été analysés au hasard pour chaque individu (n = 6 poissons par condition) et pour chaque points d'intersection (2816 au total pour chaque poisson), le type cellulaire a été noté et rapporté au nombre total de points pour obtenir un pourcentage de type cellulaire par champs. Les résultats sont donc d'abord exprimés en fraction de volume pour chaque type cellulaire (en %). Ces valeurs ont été rapportées à la masse totale du testicule pour calculer une masse spécifique pour les différents types cellulaires (en mg). Un facteur de correction a ensuite été appliqué pour ne pas prendre en compte le poids du parenchyme spermatogénique (le tissu conjonctif, le tissu gras, des canaux efférents et des vaisseaux lymphatiques et sanguins ainsi que d'autres tissus connectifs). Ainsi, le poids final (en mg) pour chaque composé cellulaire a été déterminé par le produit suivant :

$$\text{Poids final (mg)} = \text{poids du testicule (mg)} \times \text{fractions volumiques de chaque composé du testicule (\%)} \times \text{fractions volumiques du parenchyme spermatogénique (\sim 80\%)}$$



Il est ici important de préciser que le volume du parenchyme spermatogénique est environ de 20%, donc le chiffre indiqué entre parenthèses correspond en fait à  $100\% - 20\% = 80\%$ .

Par ailleurs, les fractions volumiques des cellules de Leydig (en %) ont été déterminées en marge de l'analyse morphométrique globale et elles ont été exprimées en %.

# Résultats

Le travail s'est construit en plusieurs étapes correspondant aux 3 chapitres qui structurent la partie « Résultats ». Ces différentes étapes, présentées dans le **tableau 13** ci-dessous, rappellent les objectifs généraux, les molécules étudiées et les paramètres mesurés.

**Tableau 13** : Les différentes étapes structurant la démarche expérimentale avec les objectifs, les molécules et les paramètres mesurés »

Chapitre 1		Chapitre 2	Chapitre 3
Objectifs de l'étude	Effets d'azoles et de molécules modèles sur la stéroïdogénèse	Mécanismes d'action du clotrimazole	Impact des effets induits par le clotrimazole sur la spermatogénèse
Conditions d'exposition	<i>In vivo</i> - Clotrimazole 0.145-1.45 µM - EE2: 1 nM	clotrimazole 71, 159 et 258 µg/L	clotrimazole 29, 67 et 197 µg/L
Durée d'exposition	7 jours	7 jours	21 jours
Paramètres mesurés	Gènes	Testicules: stéroïdogénèse, <i>fshr</i> , <i>lhcg</i> <u>Hypophyse</u> : <i>fshβ</i> , <i>lhβ</i>	Testicules: stéroïdogénèse, <i>fshr</i> , <i>lhcg</i> <u>Hypophyse</u> : <i>fshβ</i> , <i>lhβ</i> <u>Cerveau</u> : stéroïdogénèse, <i>gnrh3</i> <u>Foie</u> : détoxification ( <i>cyp3a65</i> , <i>cyp1a</i> ...)
	Concentrations en 11-KT	Oui (dans le sang)	Oui (dans le sang)
	Immunohistochimie	Testicules: Cyp17a1, Cyp11c1	Testicules: Cyp17a1, Cyp11c1
	Histologie	analyse morphométrique (spermatogonies) / /	analyse morphométrique de la spermatogénèse

## Chapitre I : Effets du clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le poisson zèbre adulte

### Contexte

Les cytochromes P450 impliqués dans la stéroïdogénèse sont considérés comme des cibles importantes des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (Hinfray et al., 2006; Cheshenko *et al.*, 2008). Parmi ces cytochromes, le cytochrome P450c17 est une enzyme clef de la stéroïdogénèse permettant d'aboutir à la synthèse d'androsténédione, précurseur de la synthèse d'œstrogènes et d'androgènes 11-oxygénés chez les poissons. Le cytochrome P540c17, appelé Cyp17a1, possède à la fois une activité hydroxylase et une activité lyase. Il est codé par un seul gène, le *cyp17a1*. Les azoles, utilisés comme anti-fongiques dans l'agriculture ou comme médicaments pharmaceutiques, sont des molécules qui agissent en inhibant l'activité cytochrome P450 14 $\alpha$ -déméthylase, une enzyme clef de la synthèse des membranes chez les champignons. Les azoles sont également capables d'inhiber d'autres activités cytochromes P450, incluant plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse, comme cela a été démontré sur des modèles *in vitro* de tissus de mammifères ou de poissons (Vinggaard et al., 2000; Hinfray et al., 2006; Cheshenko et al., 2008).

### Objectif et démarche expérimentale

Dans ce contexte, l'étude a eu pour buts (1) de caractériser l'expression du gène et de la synthèse de la protéine Cyp17a1 chez le poisson zèbre et (2) d'évaluer les effets d'une exposition au clotrimazole chez le mâle adulte sur l'expression du gène *cyp17a1* et sur la synthèse de sa protéine Cyp17a1 ainsi que sur la concentration en 11-kétotestostérone (11-KT) *in vivo* mais aussi *in vitro*.

Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé :

**« Caractérisation de l'expression testiculaire du cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17-20 lyase chez le poisson zèbre et de ses perturbations par le fongicide pharmaceutique clotrimazole », rédigé en anglais et publié dans General and Comparative Endocrinology (Article 1):**

Nathalie Hinfray, Damien Baudiffier, Marcelo C. Leal, Jean-Marc Porcher, Sélim Aït-Aïssa, Florence Le Gac, Rüdiger W. Schulz, François Brion, General and Comparative Endocrinology, 2011

### Résultats principaux :

Ce travail montre tout d'abord que le gène *cyp17a1*, chez le poisson zèbre adulte, est majoritairement exprimé dans les gonades mâles et femelles. L'immunolocalisation de la protéine Cyp17a1, réalisée au cours du développement des gonades, permet de constater l'apparition d'un signal dès 40 jours post-fécondation (jpf) et un immunomarquage intense à 60 jpf, notamment au niveau des cellules interstitielles dans les testicules.

L'exposition *in vivo* (0.145 – 1.45  $\mu$ M, soit 50 – 500  $\mu$ g/L) de mâles adultes au clotrimazole induit dans le testicule, de manière croissante en fonction de la dose, l'expression du gène *cyp17a1* et la synthèse de la protéine Cyp17a1. En revanche aucune modification de la concentration plasmatique de 11-KT n'est notée. Afin de comprendre comment le clotrimazole provoque *in vivo* une induction de Cyp17a1, nous avons utilisé un système de culture d'explants testiculaires récemment développé chez le poisson zèbre par (Leal et al., 2009). Nous avons ainsi testé l'hypothèse d'une action directe du clotrimazole sur l'expression de *cyp17a1*. Les données obtenues montrent qu'il n'y a pas d'effet du clotrimazole (0.2 – 5  $\mu$ M) sur l'expression de ce gène *in vitro*. En revanche, le clotrimazole inhibe la biosynthèse de 11-KT dans le milieu de culture. Il est donc probable que le clotrimazole soit capable d'inhiber une ou plusieurs activités cytochromes P450 impliquées dans le processus de la stéroïdogenèse, responsable de la synthèse d'androgènes. Par ailleurs, au niveau histologique, les coupes réalisées ont permis d'observer une augmentation du nombre des spermatogonies A après exposition au clotrimazole (**voir données supplémentaires de l'article 1**).

L'ensemble de ces données suggère que les inductions observées au niveau des testicules *in vivo* ne sont pas dues à une action directe du clotrimazole sur l'expression de *cyp17a1*. Cette induction d'une enzyme clef de la stéroïdogenèse est en accord avec des expositions du vairon à tête de boule (*Pimephales promelas*) au kétoconazole montrant une induction de l'expression de plusieurs enzymes de la stéroïdogenèse. Les auteurs de ces travaux suggèrent qu'il s'agit d'une réponse de compensation impliquant des rétrocontrôles au niveau du complexe hypothalamo- hypophysaire (Ankley *et al.*, 2007; Villeneuve *et al.*, 2007b). Cette hypothèse restait cependant à confirmer d'un point de vue mécanistique.

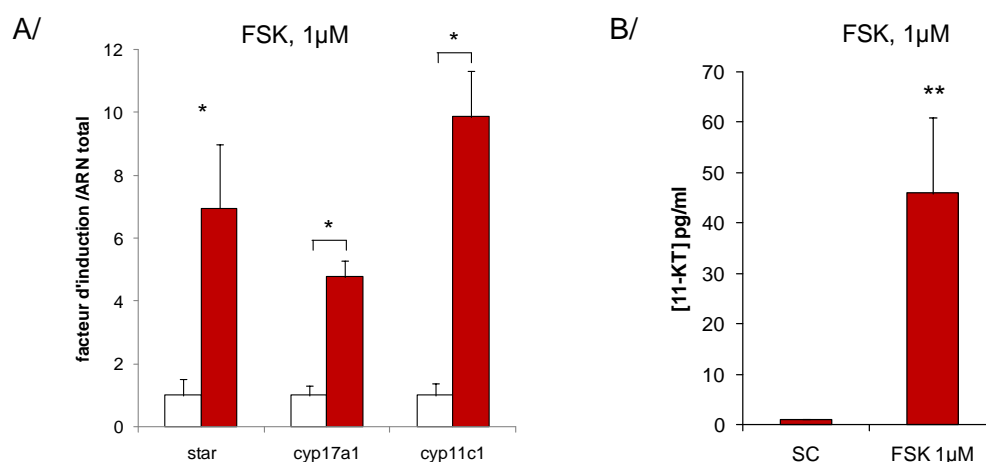
Par ailleurs, en considérant l'effet inhibiteur du clotrimazole sur la synthèse et/ou la libération de la 11-KT *in vitro*, on peut s'interroger sur la capacité d'autres azoles à induire des effets similaires.

### Résultats complémentaires

Des expérimentations complémentaires ont été réalisées sur le modèle de culture d'explants testiculaires. En effet, au vu des résultats obtenus pour le clotrimazole, il nous a paru intéressant d'analyser les effets d'autres azoles, notamment sur la biosynthèse hormonale *in vitro*. Initialement, le clotrimazole avait retenu notre attention pour sa capacité à inhiber l'activité aromatasase chez la truite à des concentrations très faibles (Hinfrey et al., 2006). Dans cette étude, réalisée au laboratoire, il a été montré que le clotrimazole inhibait fortement les activités aromatasases dans des microsomes d'ovaires et de cerveau de truites. Ainsi, après exposition au clotrimazole à 10  $\mu$ M pendant 1 heure, les activités aromatasase étaient inhibées de 96% et 100% dans le cerveau et les ovaires, respectivement. D'autres azoles avaient également été testés, notamment le fenbuconazole et le propiconazole. L'étude montrait qu'ils inhibaient également l'activité aromatasase dans le cerveau et les ovaires. Comparativement au clotrimazole, ces deux composés présentaient des potentiels d'inhibition moins importants.

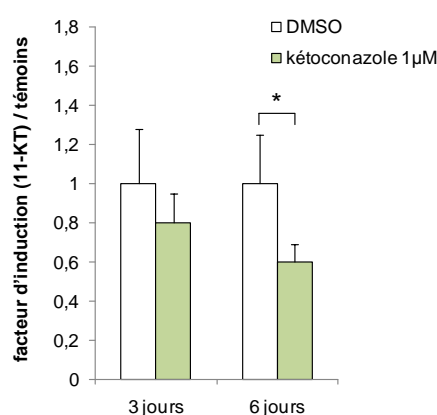
Nous avons donc choisi d'exposer des explants testiculaires à ces deux azoles, mais également au kétononazole, un azole modèle, qui a fait l'objet de nombreux travaux concernant ces effets sur la stéroïdogénèse chez le vairon à tête de boule (Ankley et al., 2002; Ankley et al., 2007; Villeneuve et al., 2007a; Zhang et al., 2008a).

Conjointement aux azoles, la forskoline (FSK) a été utilisée comme témoin positif. La FSK est un activateur de la voie AMPc. En accord avec les travaux de (Leal et al., 2009), nous avons montré qu'elle induisait l'expression de gènes clefs impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse à 1 $\mu$ M (*star*, *cyp17a1*, *cyp11c1*, **figure 12A**) ainsi que la synthèse/libération de 11-KT dans le milieu de culture (**figure 12B**). Dans notre étude, c'est pour cette propriété que nous l'avons choisie, afin de stimuler la synthèse basale de 11-KT. Dans le cadre de l'étude des effets des azoles, qui agissent en inhibant les activités enzymatiques des CYPs, c'est une propriété qui permet potentiellement d'augmenter la sensibilité du test, notamment en ce qui concerne la mesure de la biosynthèse de 11-KT.



**Figure 12 :** Effets *in vitro* de la forskoline (FSK, [1 µM]) sur (A/) l'expression de gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogenèse et (B/) la synthèse/libération de 11-KT dans le milieu de culture après une exposition d'explants testiculaires pendant 6 jours. Pour le panel A, les données sont représentées en moyennes d'expression relative par rapport aux témoins  $\pm$  S.E.M (n = 3 – 7 poissons par condition). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

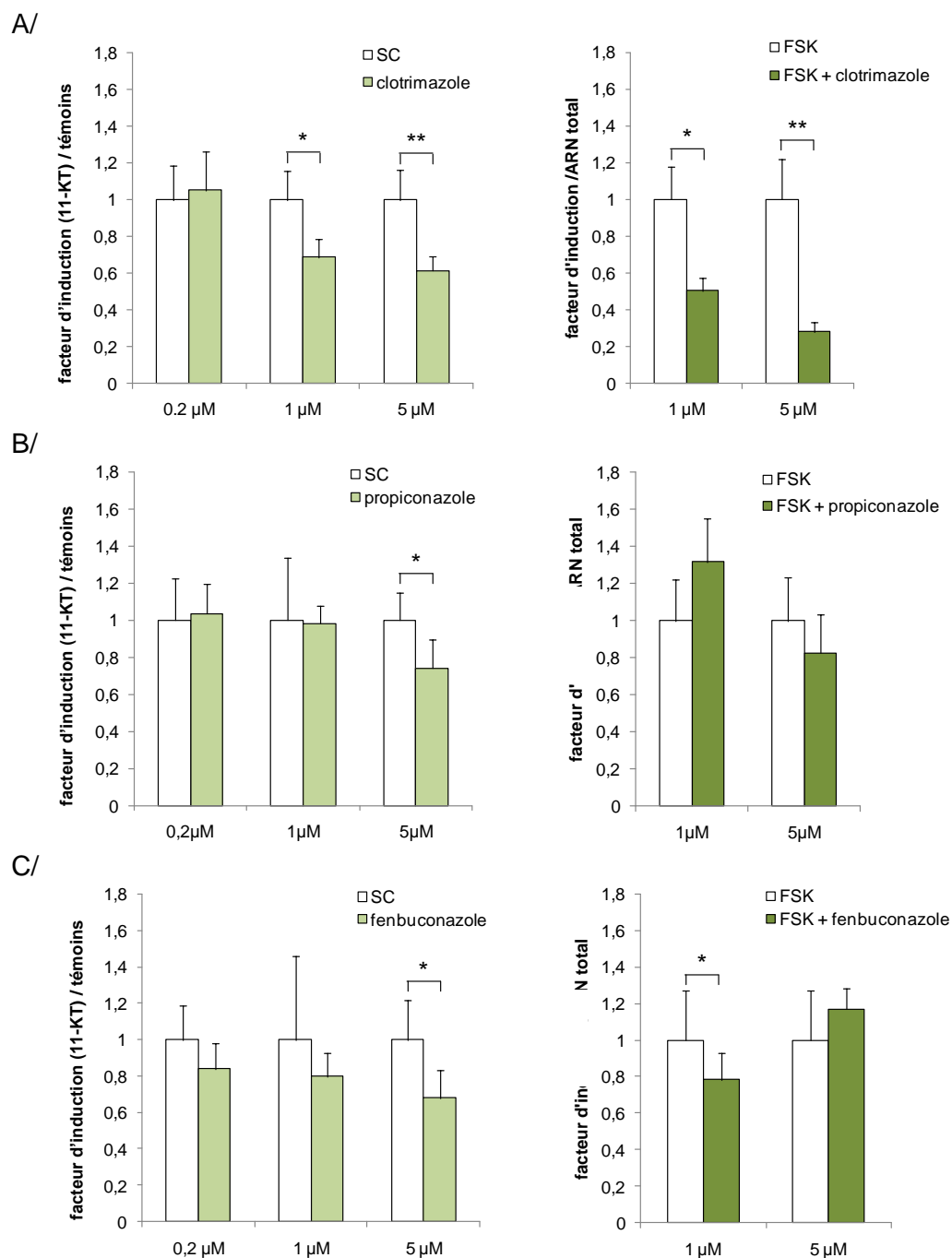
Les expositions aux azoles ont donc été réalisées seules ou en co-traitement avec la FSK. Les résultats, présentés dans les **figures 13 et 14**, montrent que les azoles inhibent la synthèse/libération de 11-KT dès 1 µM pour le kétoconazole (**figure 13**) et à 5 µM pour le propiconazole et le fenbuconazole. (**figure 14**). Le co-traitement avec la FSK rend l'inhibition plus marquée pour le clotrimazole, ce qui n'est pas le cas avec les deux autres azoles.



**Figure 13 :** Effet *in vitro* du kétoconazole seul sur les niveaux de 11-KT mesurés dans le milieu de culture après une exposition d'explants testiculaires pendant 3 et 6 jours. Les données sont représentées sous forme de moyenne de concentration en 11-KT relative par rapport aux témoins  $\pm$  S.E.M (n = 3-17) poissons par condition). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Au regard du potentiel d'inhibition des activités aromatasase des azoles testés dans des microsomes de truite (Hinfray et al., 2006), les résultats de notre étude semblent cohérents, avec un effet plus marqué pour le clotrimazole (40% d'inhibition à 5 µM seul) que pour le

propiconazole (25% d'inhibition à 5 $\mu$ M seul) et le fenbuconazole (35% d'inhibition à 5 $\mu$ M seul). Le kétoconazole semble également avoir un potentiel d'inhibition élevé (40% d'inhibition à 1 $\mu$ M comparé à 30% d'inhibition pour le clotrimazole à 1 $\mu$ M).



**Figure 14 :** Effets *in vitro* de plusieurs azoles seuls ou en co-traitement avec la forskoline (FSK) sur les niveaux de 11-KT mesurés dans le milieu de culture après une exposition d'explants testiculaires pendant 6 jours. Les données sont représentées sous forme de moyenne de concentration en 11-KT relative par rapport aux témoins  $\pm$  S.E.M (n = 3-17 poissons par condition). \* p<0,05, \*\* p<0,01.



En revanche, comme observé pour le clotrimazole (article 1), les azoles testés ici n’ont aucun effet sur l’expression des gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse (Tableau 14).

**Tableau14** : Effets d’azoles sur l’expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse après exposition d’explants testiculaires (facteur d’induction par rapport aux individus témoins)

fenêtre d'exposition	conc. (µM)	contrôle	kétoconazole			clotrimazole			propiconazole			fenbuconazole		
			star	cyp17a1	cyp11c1	star	cyp17a1	cyp11c1	star	cyp17a1	cyp11c1	star	cyp17a1	cyp11c1
3 jours	0,2	DMSO	NA	NA	NA	1,75 ± 0,44	1,38 ± 0,12	NA	1,42 ± 0,52	1,24 ± 0,35	1,76 ± 0,63	NA	NA	1,92 ± 0,51
	1	DMSO	NA	NA	NA	1,2 ± 0,24	NA	1,24 ± 0,28	0,70 ± 0,23	1,24 ± 0,18	0,58 ± 0,15	1,02 ± 0,10	1 ± 0,34	1,33 ± 0,34
6 jours	0,2	DMSO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,32 ± 0,87	1,64 ± 0,20	1,78 ± 0,78	2,54 ± 0,34	1,40 ± 0,49	1,87 ± 0,48
	1	DMSO	1,81 ± 0,61	1,57 ± 0,49	1,37 ± 0,31	1,59 ± 0,37	1,11 ± 0,23	NA	1,02 ± 0,5	1,08 ± 0,26	1,73 ± 0,98	0,94 ± 0,28	0,86 ± 0,14	NA
6 jours			kétoconazole + FSK			clotrimazole + FSK			propiconazole + FSK			fenbuconazole + FSK		
	1	FSK	NA	NA	NA	1,25 ± 0,24	0,66 ± 0,24	0,91 ± 0,15	1,55 ± 0,47	NA	NA	0,59 ± 0,15	0,38 ± 0,12	0,54 ± 0,15
	5	FSK	NA	NA	NA	1,65 ± 0,41	1,10 ± 0,33	1,55 ± 0,34	1,45 ± 0,38	1,69 ± 0,47	1,63 ± 0,37	NA	NA	NA

FSK = forskoline, , [µM]; NA = Not Available

Ces résultats complémentaires viennent appuyer les résultats obtenus dans l'**article 1** pour le clotrimazole, qui *in vitro* inhibe la production de 11-KT sans modifier l'expression des gènes impliqués dans sa synthèse. Ils mettent en avant l'intérêt du modèle de culture d'explants testiculaires dans l'étude des mécanismes d'action des azoles. Nous avons donc ici un modèle capable de répondre à des composés chimiques en terme de synthèse/libération de stéroïdes à des concentrations proches de celles utilisées *in vivo*.

On peut donc s'interroger sur l'utilisation de ce modèle pour évaluer les effets de composés chimiques sur la stéroïdogénèse, voir pour réaliser du criblage. Il présente l'avantage de prendre en compte l'appariement des échantillons, avec un testicule témoin et en parallèle un testicule exposé provenant d'un même individu, réduisant ainsi la variabilité. Le prélèvement des échantillons pour la mesure de la synthèse/libération de 11-KT est simple (milieu) et la quantification de la 11-KT par méthode ELISA est sensible et spécifique. En revanche, le système de culture est relativement complexe dans sa mise en œuvre et le dosage de 11-KT est couteux. Le temps d'exposition est également relativement long (6 jours) et les effets observés après 3 jours d'exposition sont non significatifs pour la concentration en 11-KT dans les milieux de culture (données non montrées). De plus, dans ce système complexe, nous ne connaissons pas la disponibilité du contaminant pour le testicule. En effet, le composé chimique, initialement introduit dans le milieu de culture, va atteindre le testicule par transfert dans un bloc d'agarose, puis une membrane de nitrocellulose.

Chez les poissons, des cultures d'explants gonadiques chez la truite ont déjà été utilisées *in vitro* afin d'étudier les effets d'azoles sur l'ovaire (Monod *et al.*, 1993 ; Rime *et al.*, 2010). Ils ont montré l'intérêt d'un tel modèle dans l'étude des mécanismes d'action des azoles et ont par exemple mis en évidence que le clotrimazole inhibait la sécrétion d'E<sub>2</sub> dans des culture d'explants ovocytaires (Monod *et al.*, 1993). Plus récemment, une étude rapporte le développement d'un système de culture de gonades (testicules et ovaires) chez la truite dans le but d'évaluer les effets de composés chimiques sur la stéroïdogénèse (Marca Pereira *et al.*, 2011). Les auteurs concluent que ce système peut être utilisé pour détecter les perturbations de la stéroïdogénèse en mesurant la concentration en stéroïdes (œstradiol et testostérone) dans le milieu de culture. Dans ce modèle, les explants gonadiques sont exposés pendant 2 jours avant de mesurer les paramètres biologiques finaux, à savoir les stéroïdes. Des résultats préliminaires montrent tout d'abord que la concentration en stéroïdes dans le milieu de culture est augmentée après exposition à des extraits hypophysaires, ce qui suggère que le système répond bien à une stimulation aux gonadotropines. Dans un second temps, les

auteurs ont exposés les explants gonadiques à divers composés chimiques, dont un azole : le prochloraz. Les mesures effectuées montrent une inhibition de la synthèse/libération de la testostérone et de l'oestradiol dans les cultures d'explants testiculaires et ovariens, respectivement.

Dans notre cas, la culture d'explant testiculaire semble être un modèle pertinent pour de l'étude mécanistique. Elle pourrait également être utilisée pour détecter des composés qui perturbent la stéroïdogénèse mais des mises au point semblent nécessaires pour rendre son utilisation moins lourde.

### Conclusions

Notre étude démontre pour la première fois que le clotrimazole est capable d'affecter *in vivo* l'expression testiculaire du gène jusqu'à la synthèse de la protéine Cyp17a1, une enzyme clef de la stéroïdogénèse. Par ailleurs, en utilisant un modèle *in vitro* d'explant testiculaire, nous mettons en évidence une action directe du clotrimazole, mais aussi du kétoconazole, du propiconazole et du fenbuconazole sur le testicule, sur l'inhibition de la libération de 11-KT dans le milieu de culture. Cette baisse de la concentration de 11-KT dans le milieu est probablement due à l'inhibition d'une ou plusieurs activités enzymatiques intervenant dans le processus de la stéroïdogénèse. Par ailleurs, les différences observées entre les résultats *in vivo* et *in vitro* suggèrent que l'induction de la stéroïdogénèse *in vivo* n'est pas due à une action directe du clotrimazole et pourrait s'expliquer par des rétrocontrôles au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire. Par ailleurs, le système de culture d'explants testiculaires, initialement développé pour étudier la spermatogénèse, semble pertinent pour évaluer les effets de perturbateurs sur la stéroïdogénèse, même si une utilisation en routine pour de la détection ou du screening nécessite des études plus poussées.



## Characterization of testicular expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole

Nathalie Hinfray<sup>a</sup>, Damien Baudiffier<sup>a</sup>, Marcelo C. Leal<sup>b</sup>, Jean-Marc Porcher<sup>a</sup>, Sélim Aït-Aïssa<sup>a</sup>, Florence Le Gac<sup>c</sup>, Rüdiger W. Schulz<sup>b</sup>, François Brion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de l'environnement industriel et des risques (INERIS), Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, BP 2, 60550 Vemouil-en-Halatte, France

<sup>b</sup> University of Utrecht, Science Faculty, Department Biology, Division Developmental Biology, Reproductive Biology Group, Kruyt Bldg. Room W-606, Padualaan 8, NL-3584 CH Utrecht, The Netherlands

<sup>c</sup> Institut de recherche agronomique (INRA), Station Commune de Recherches en Ichtyophysologie, Biodiversité et Environnement (SCRIBE), Physiologie testiculaire et puberté chez les poissons, Campus Beaulieu, Bâtiment 16A, 35042 Rennes, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 March 2011

Revised 2 September 2011

Accepted 9 September 2011

Available online 22 September 2011

#### Keywords:

Zebrafish

Steroidogenesis

*cyp17a1*

Pharmaceutical

Clotrimazole

Testis culture

### ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (*cyp17a1*) expression in zebrafish and to assess the effect of the pharmaceutical clotrimazole, a known inhibitor of various cytochrome P450 enzyme activities, on testicular gene and protein expression of this enzyme as well as on the testicular release of 11-ketotestosterone (11-KT), a potent androgen in fish. We first showed that *cyp17a1* is predominantly expressed in gonads of zebrafish, notably in male. *In vivo*, clotrimazole induced a concentration-dependent increase of *cyp17a1* gene expression and Cyp17-I protein synthesis in zebrafish testis. Using zebrafish testicular explants, we further showed that clotrimazole did not directly affect *cyp17a1* expression but that it did inhibit 11-KT release. These novel data deserve further studies on the effect ofazole fungicides on gonadal steroidogenesis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) represent a wide range of environmental contaminants that interfere with the endocrine system through multiple modes of action. During the last decades, many of synthetic chemicals present in the aquatic environment have been shown to interact as agonists with the estrogen receptor (ER) and to elicit biological responses similar to estradiol [38]. However, other mechanisms can account for endocrine disruption in aquatic organisms. Cytochromes P450 involved in the synthesis of steroid hormones are considered as important EDCs targets in vertebrates [8,20]. Among them, cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase (Cyp17) is a key steroidogenic enzyme essential for cortisol production in adrenal tissues and for the production of sex steroids in gonadal tissues. The Cyp17 enzyme possesses both the 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase activities. The 17 $\alpha$ -hydroxylase activity of Cyp17 converts pregnenolone to 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone and progesterone to 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. The 17,20-lyase activity is required for the production of sex steroids since it cleaves the C17,20 bond to convert 17 $\alpha$ -hydroxy-

pregnenolone to dehydroepiandrosterone or 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to androstenedione, which is an important precursor for the production of estrogens and 11-oxygenated androgens. In rice field eel gonads, the *cyp17* gene generates four isoforms of Cyp17 protein by alternative splicing and polyadenylation processes [44]. In two fish species, tilapia and medaka, two Cyp17 protein isoforms (Cyp17-I and Cyp17-II) encoded by two different genes (*cyp17a1* and *cyp17a2*) were identified [45,46]. The Cyp17-I isoform showed both the hydroxylase and lyase activities while the Cyp17-II isoform showed only the lyase activity [45]. An *in silico* search revealed the existence of two different *cyp17* genes in the genomes of fugu, stickleback, tetraodon, and zebrafish [45]. In catfish and zebrafish, full length cDNA encoding Cyp17 from ovary were cloned corresponding to the *cyp17a1* gene [36,43]. In these fish species, *cyp17a1* was expressed predominantly in gonadal and adrenal tissues but expression was also found in brain, liver, kidney, gills, heart, muscle, and intestine [36,43].

Azole fungicides are widely used in agriculture, but also as antifungal agents in human and veterinary medicine, and some of them are used in the treatment of hormone-dependant cancer. Their antifungal activity is based on their ability to inhibit cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase activity, a key enzyme in the formation of fungal membranes. They also have been shown to

\* Corresponding author. Fax: +33 3 44 55 66 05.  
E-mail address: [francois.brion@ineris.fr](mailto:francois.brion@ineris.fr) (F. Brion).

inhibit other cytochrome P450 activities *in vitro*, including several P450 involved in steroidogenesis such as Cyp17 [4] and P450 aromatase activities [20,28,40]. Although the occurrence and fate of azole fungicides in the aquatic environment are poorly documented, several azoles such as clotrimazole, propiconazole, fluconazole, or tebuconazole have been measured in surface waters of rivers, lakes and estuaries in several countries at concentrations ranging from the low ng/L to the low µg/L range [5,21,23,30,33,37]. However, little is known about their *in vivo* endocrine disrupting potency in fish [6].

The aim of this study was first to characterize *cyp17a1* gene expression and Cyp17-I protein synthesis in zebrafish, and to assess the *in vivo* effects of clotrimazole, a pharmaceutical azole fungicide, in a model fish species the zebrafish. For that purpose, we first characterized the expression of *cyp17a1* gene in male and female zebrafish brain and gonads. For comparative purpose, expression of the specific isoforms of aromatase genes, *cyp19a1a* and *cyp19a1b*, was also analyzed. Using specific polyclonal antibodies against zebrafish Cyp17-I, Cyp17-I protein was analyzed in gonads at different developmental stages. Then, the effects of clotrimazole on the testicular *cyp17a1* gene expression and Cyp17-I protein amounts were assessed both *in vivo* and *ex vivo* using a zebrafish testicular explant model. In addition, the effect of clotrimazole on the release of 11-ketotestosterone (11-KT), a potent androgen in fish, was assessed both *in vivo* and *ex vivo*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fish origin and maintenance

Wild type larvae and adult zebrafish (AB strain) originated from our breeding unit (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France). Adult zebrafish were maintained in 3.5 L aquaria in a recirculation system (Zebtec, Techniplast) on a 14:10 light:dark cycle at a temperature of  $25.1 \pm 1.0$  °C. They were allowed to reproduce (2 males for 1 female) at a temperature of 27 °C, and fertilized eggs were harvested. Eggs were disinfected 5 min in water supplemented with 0.1% of commercial bleach (2.6% of sodium hypochlorite). Eggs/larvae were maintained in semi-static conditions until 8 days post fertilization (dpf) and then transferred in 3.5 L aquaria of the Zebtec system (around 25 larvae per liter) to grow. Larvae were fed around 20% of their weight per day with: protogen (once at 8dpf, Europrix, France); seramicron (7–21 dpf, Europrix, France); tetramin baby (21–45 dpf, Europrix, France); tetramin junior (45–60 dpf, Europrix, France) and living artemia (15–60 dpf).

### 2.2. Exposures of adult zebrafish

Exposures of adult male zebrafish to clotrimazole or solvent alone (DMSO, 0.004% v/v) were realized in 4-L tanks for 7 days under semi-static conditions with a total renewal of the water every day. Two independent experiments were performed. In the first experiment, the effect of one concentration of clotrimazole (1.45 µM = 500 µg/L) on testis *cyp17a1* gene expression was assessed and compared to a control group. Exposure was performed in one tank per condition, each containing 10 male fish. In the second experiment, the effect of graded concentrations of clotrimazole (0.145; 0.290; 0.725, and 1.45 µM equivalent to 50, 100, 250, and 500 µg/L, respectively) on testis *cyp17a1* gene expression and Cyp17-I protein synthesis was determined. Two replicated tanks, each containing 10 male zebrafish were used for each concentration.

At the end of the exposure period, fish were euthanized in ice cold water, measured and weighed. Gonads were removed,

weighed, and the gonadosomatic index (GSI) was calculated as (gonad wet weight/total fish wet weight)  $\times$  100.

### 2.3. Determination of *cyp17a1*, *cyp19a1a*, and *cyp19a1b* mRNA levels

After dissection, tissues were immediately stored at 4 °C in RNAlater™ (Sigma–Aldrich, France) (10 mg of tissue/300 µl) to stabilize and protect cellular RNA by immediate RNase inactivation. Samples were kept at 4 °C overnight and stored at –20 °C until mRNA level measurements.

*Cyp17a1*, *cyp19a1a*, and *cyp19a1b* mRNA levels were measured by specific branched DNA assay (QuantiGene, Genospectra, Fremont, CA, USA) as previously described by [19]. Briefly, tissues were lysed and incubated in a 96-well plate coated with synthetic oligonucleotides in the presence of a specific probe set designed according to the *cyp17a1*, *cyp19a1a*, or *cyp19a1b* mRNA sequences (Gene Bank Accession Nos. AY281362.1, AF183906, and AF183908, respectively). Capture probe allowed capture of the target mRNA to the synthetic oligonucleotide. Blocking probe linearized the target mRNA and a labeled probe hybridized to the target mRNA and to a branched DNA (bDNA) coupled with alkaline-phosphatase-bound probes. Addition of a chemiluminescence substrate (dioxetan) yields a luminescence signal that is proportional to the amount of mRNA present in the sample. Quantification of luminescence was made on a microplate luminometer (Wallac Victor2, Perkin Elmer, Courteboeuf, France). *Cyp17a1*, *cyp19a1a*, and *cyp19a1b* expression values were normalized to a housekeeping gene, *zf β-actin1* (Gene Bank Accession No. NM\_131031), which has been shown to be stably expressed in zebrafish following chemical treatments [26]. Measurements of target and housekeeping genes were realized in triplicate for each gene and each sample.

### 2.4. Production of zebrafish Cyp17-I antiserum

Due to the lack of specific anti-zebrafish Cyp17 antibodies available, an antiserum was produced in rabbits. The antiserum was directed to the synthetic peptides AFADYSSTWKFHRK and KVRADWEKSPLMQHC coupled to keyhole limpet hemocyanin, corresponding to the amino acids 126–139 and 505–519, respectively, of the zebrafish Cyp17-I sequence (AAP41821). Two rabbits were immunized by intradermic injection of 500 µg purified synthetic peptides emulsified in Freund's complete adjuvant. Two booster injections of purified synthetic peptides in Freud's incomplete adjuvant were given three and six weeks followed by a subcutaneous injection eight weeks after the first injection. The rabbits were bled through the ear vein ten days after the last dose injection. The resulting antiserum was purified by affinity chromatography. The specificity of the *zf*-Cyp17-I antibody has been confirmed in Western-blotting and immunohistochemistry experiments as recently reported by de Waal et al. [10].

### 2.5. Histological analysis of the testis

Thirty, 40, 60 and 180-dpf-old zebrafish were euthanized in ice cold water. Samples were fixed in Bouin's fluid for 48 h at 4 °C. After fixation, samples were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin, according to conventional procedures. Samples were sectioned at 5 µm (longitudinal sections for juvenile fish and transversal sections for adult testis) and stained with Hemalun–Eosin or processed for fluorescent immunohistochemistry as described below. For immunohistochemistry, sections were mounted on gelatin coated slides.



## 2.6. Fluorescent immunohistochemistry

Cyp17-I labeling on zebrafish larvae were performed by fluorescent immunohistochemistry. Sections were dewaxed and rehydrated, and antigens were unmasked for 3 h at 80 °C in ethylenediaminetetraacetic acid buffer (pH 8.5). Tissue sections were then incubated for 1 h in a saturation PBS solution containing 0.2% Triton X-100 and 1% milk powder. Incubation with the anti-zf Cyp17-I antibody was performed overnight (1:300 with 0.5% milk powder in PBS) at room temperature. After rinsing, sections were incubated for 1 h 30 with a goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa fluor 594 (1:200 with 0.5% milk powder in PBS). The specificity of the staining was controlled by processing adjacent sections without primary antibody, with the pre immune serum or with the antibody pre-absorbed with the synthetic peptides.

## 2.7. Colorimetric immunohistochemistry

Cyp17-I labeling on adult zebrafish testis of the second *in vivo* exposure was performed by colorimetric immunohistochemistry. Samples were fixed in PBS (pH 7.4) containing 4% of paraformaldehyde for 48 h at 4 °C, and entirely processed for frozen sections (12 µm). Immunohistochemistry was performed as described previously [27] with some minor modifications. Briefly, endogenous peroxidase activity was blocked in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 45 min. Tissue sections were then incubated for 1 h in a saturation PBS solution containing 0.2% Triton X-100 and 0.5% milk powder. Incubation with the zf-Cyp17-I antibody was performed overnight (1:300 with 0.5% milk powder in PBS). After rinsing, sections were incubated for 1 h 30 min with a goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:1500). Cyp17-I immunoreactivity was revealed by using 3,3' diaminobenzidine as peroxidase substrate. As for fluorescent immunohistochemistry, all the specificity controls were included.

## 2.8. Primary culture of zebrafish testis

Zebrafish testes were cultured as previously described by Leal et al. [24] with some minor modifications. Briefly, male zebrafish were anaesthetized in ice-cold water and decapitated. The testes were removed, rinsed in PBS buffer (D-PBS + 1 mM CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen Ltd., CA, USA), then immersed for 2 min in PBS buffer supplemented with 0.5% of commercial bleach (2.6% of sodium hypochlorite) and finally rinsed in PBS buffer for 2 min. The two testes of a zebrafish were incubated in parallel, one serving as control for the contra-lateral one. During the culture, testis explants were placed on a nitrocellulose membrane, itself resting on a 750 µl cylindrical agarose bloc (1.5% w/v prepared into Ringer's solution: 153.6 mM NaCl, 3.08 mM KCl, 5.04 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, 0.1% glucose, adjusted to pH 7.4) placed in 1 ml of culture medium in 24-well flat bottom culture plates (Corning Inc., New-York, USA). The culture medium (pH 7.4) consisted of Leibowitz' L-15 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10 mM Hepes (Merck, Darmstadt, Germany), 0.3 µg/ml amphotericin B (Fungizone, Invitrogen), 100 U/ml antibiotics (penicillin/streptomycin, Invitrogen), 0.5% w/v Bovine Serum Albumin (fraction V) (Sigma-Aldrich, France), 10 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 50 ng/ml red sea bream IGF-1 (ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Israel). For *in vitro* exposures to contaminants, forskolin (FSK, 1 µM final concentration), clotrimazole (Clot; 0.2; 1, and 5 µM final concentration) or DMSO alone (0.017% final concentration) were added to the culture medium. Incubations were performed for 6 days at 25 °C in a humidified air atmosphere and the medium was renewed once after 3 days. At the end of the exposure period, testes were transferred into RNAlater® solution (Sigma-Aldrich, France) for mRNA

analysis and culture medium were stocked at –80 °C until 11-ketotestosterone (11-KT) concentrations analysis.

## 2.9. 11-Ketotestosterone analysis

Blood plasma concentrations of 11-ketotestosterone (11-KT) were measured in male fish sampled at the end of exposure period. Blood was collected by cardiac puncture using a heparinized syringe (1000 U of heparin per ml). The blood was transferred into Eppendorf tubes (held on ice) containing EIA buffer supplemented with protein inhibitor (PMSF, 1 mM) and heparin (1000 U/ml). Typically, this technique yield 2.5–5 µl of blood. Blood was diluted 1:10 (v:v) in EIA buffer (PMSF 1 mM, heparin 1000 U/ml), vortexed, centrifuged (3000g, 15 min, 4 °C) and stored at –20 °C until analysis. 11KT analyses were achieved using an 11-KT Enzyme Immuno Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA) performed according to the manufacturer's protocol. Each blood samples (diluted 1:10 in EIA buffer) were serially diluted and run in duplicate. As shown in Fig. 1S (supplementary data), each sample, collected and proceeded as described above, run parallel to the 11-KT standard curve allowing an accurate quantification of 11-KT concentrations.

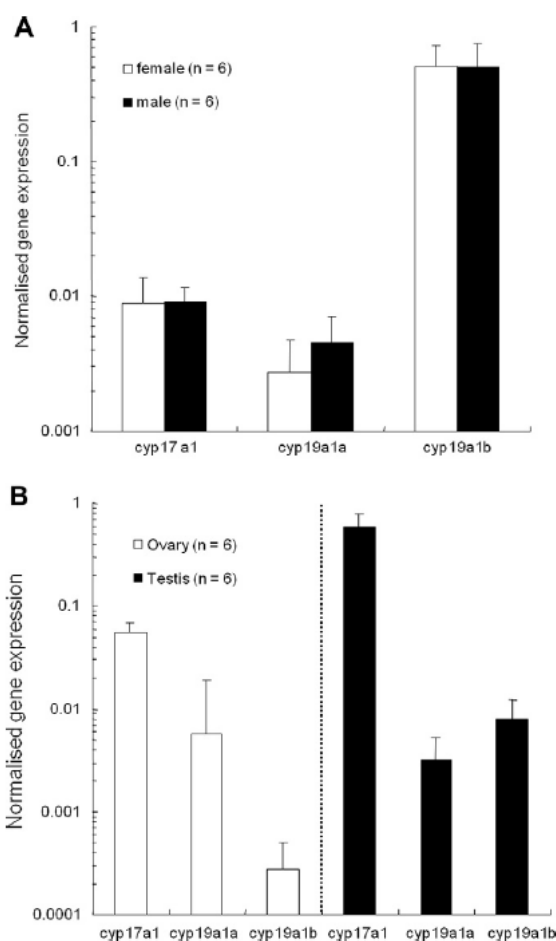


Fig. 1. Expression of *cyp17a1*, *cyp19a1a*, and *cyp19a1b* genes in brain (A) and gonads (B) of adult zebrafish. Target genes expressions were normalized by the expression of the beta-actin gene. Results are expressed as mean ± SD. N indicates the number of individual fish used to measure target and housekeeping genes.

In culture medium, concentrations of 11-KT were measured by serially diluting each sample in EIA buffer, with at least three dilutions run in duplicate. As shown in Fig. 1S, samples were parallel to the 11-KT standard curve allowing accurate quantification. The specificity of the 11-KT EIA antiserum given by the manufacturer is as follow: 11-KT testosterone (100%), Adrenosterone (2.9%), 4-Androsten-11 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol-3-one (0.01%), 5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one (<0.01%), 5 $\alpha$ -Androsten-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol (<0.01%) and Testosterone (<0.01%).

### 3.10. Data analysis and statistics

For *in vivo* data, differences between groups were analyzed for statistical significance with a Kruskal–Wallis test and a Mann–Whitney *U* test. For *ex vivo* data, differences between controls and exposed testes were analyzed using a paired *t*-test. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and differences between groups were considered to be significant if  $p < 0.05$ .

To document results of immunohistochemistry experiments, all micrographs were taken with a Zeiss Apotome Upright microscope with the Axiovision software. No alterations were made on the micrographs after taking the picture. All micrographs were analyzed with image J software. For immunolabeling of Cyp17-I in the adult testis, the analysis reports the ratio between the labeled surface and the total surface of the testis.

## 3. Results

### 3.1. Cyp17a1 gene expression in gonads and brain of adult zebrafish

Analysis of the *cyp17a1*, *cyp19a1a*, and *cyp19a1b* mRNA levels in the brain and the gonads of male and female were achieved by using specific bDNA assays. A low but significant expression of *cyp17a1* was found in the brain of adult male and female zebrafish without any obvious sexual dimorphism (Fig. 1A). *cyp17a1* gene expression in the brain of male and female was at least 50-fold lower than *cyp19a1b*. In the ovary and testis, a strong expression of *cyp17a1* gene was measured (Fig. 1B). As compared to *cyp19* genes, *cyp17a1* was predominantly expressed in the ovary and testis.

### 3.2. Immunolocalization of cells expressing Cyp17-I in the gonads

By means of immunohistochemistry, we further investigated the cellular localization of Cyp17-I protein within the gonads of zebrafish at various stages of their development, from histologically undifferentiated gonads to mature testis and ovary. As shown in Fig. 2, no immunoreactive cell was observed in histologically undifferentiated gonads of 30 dpf juvenile zebrafish. At 40 dpf, only a few immunoreactive cells were found in early-differentiated ovaries while more immunoreactive cells were found in presump-

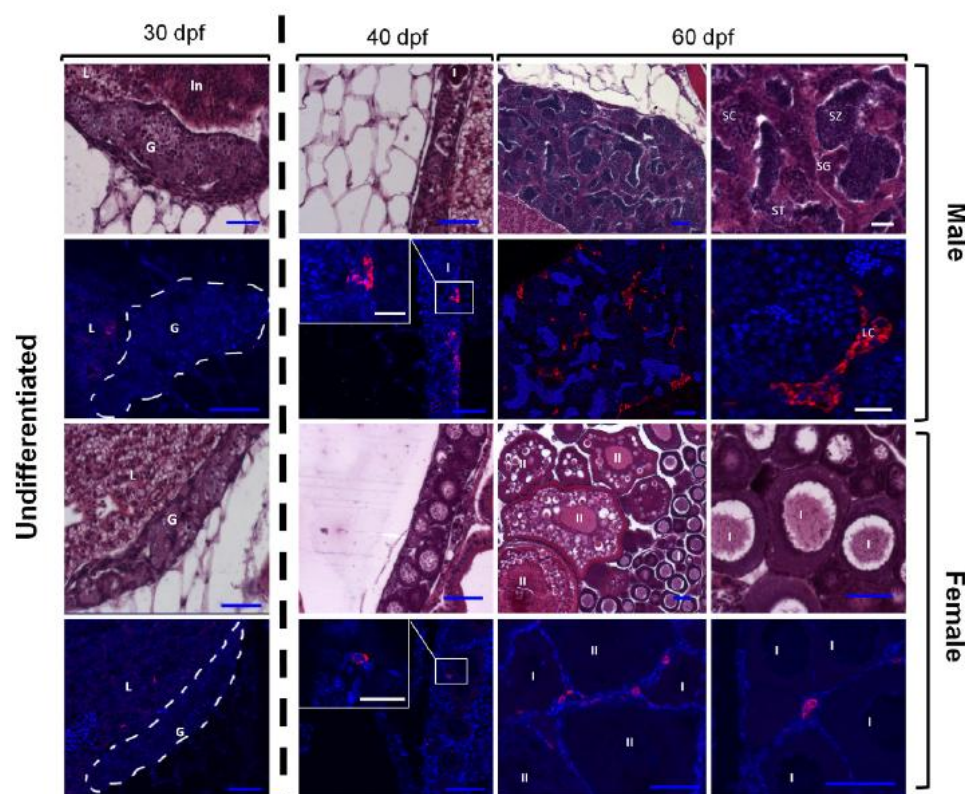


Fig. 2. Immunolocalization of Cyp17-I protein during zebrafish gonad development. Red: P450c17 immunostaining, blue: Hoechst. Haemalun–Eosin stainings were performed on adjacent sections. No labeling was observed in undifferentiating gonads of 30 days post fertilization (dpf) zebrafish. At 40 dpf, numerous immunoreactive cells were noted in testis (somatic cells) while few immunoreactive cells were observed in ovaries (follicle cells). At 60 dpf, strong immunoreactivity was detected in interstitial cells of testis, and in follicular cells of ovaries.  $N = 6$  fish/stage of development. G: gonad, I: primary oocyte, II: secondary oocyte, In: intestine, L: liver, LC: interstitial cells, SC: spermatocytes, SG: spermatogonia, ST: spermatids, SZ: spermatozoa. Scale bars represent 50  $\mu$ m (blue) and 20  $\mu$ m (white).



**Table 1**  
Biometric parameters and 11-ketotestosterone circulating levels in male zebrafish following a 7 days exposure to clotrimazole. Data are mean  $\pm$  SD. N: number of fish.

	N	Body weight (mg)	Gonad weight (mg)	Total length (mm)	GSI (%)	Circulating [11-KT] (ng/ml)
Solvent control	10	332.6 $\pm$ 34.3	5.0 $\pm$ 1.7	327 $\pm$ 17	1.49 $\pm$ 0.40	9.9 $\pm$ 4.8
Clotrimazole 0.145 $\mu$ M	10	379.2 $\pm$ 89.0	8.3 $\pm$ 4.7	338 $\pm$ 16	2.11 $\pm$ 0.73	13.0 $\pm$ 8.4
Clotrimazole 0.290 $\mu$ M	10	351.3 $\pm$ 98.8	6.7 $\pm$ 2.3	330 $\pm$ 24	1.98 $\pm$ 0.90	6.9 $\pm$ 1.9
Clotrimazole 0.725 $\mu$ M	10	339.6 $\pm$ 71.4	6.1 $\pm$ 2.0	334 $\pm$ 18	1.76 $\pm$ 0.27	8.1 $\pm$ 4.7
Clotrimazole 1.45 $\mu$ M	10	332.0 $\pm$ 60.1	6.5 $\pm$ 2.1	323 $\pm$ 21	1.93 $\pm$ 0.30	10.4 $\pm$ 6.4

tive testis. In well-differentiated ovaries of 60 dpf zebrafish, we found expression of the Cyp17-I protein in follicular cells surrounding the oocytes. In 60 dpf zebrafish testes, strong immunolabeling was observed in interstitial cells.

### 3.3. In vivo effect of clotrimazole on testicular *cyp17a1* gene expression, Cyp17-I protein synthesis and on circulating 11-KT concentrations

After examining *cyp17a1* gene expression in untreated zebrafish, we assessed the *in vivo* effect of clotrimazole on its testicular expression in adult zebrafish. *In vivo* exposure to clotrimazole for 7 days had no significant effect on body weight, gonad weight, total length or GSI (Table 1). In a first experiment, zebrafish were exposed to a single dose of clotrimazole (1.45  $\mu$ M). The results showed the ability of this compound to induce markedly *cyp17a1* gene expression by a factor 7 as compared to control group (Fig. 3A). In a second independent experiment, exposing zebrafish to graded concentrations of clotrimazole for 7 days, we measured a

concentration-dependent increase in *cyp17a1* mRNA levels with a significant effect from the lowest concentration of clotrimazole tested (Fig. 3B), and with an induction in response to 1.45  $\mu$ M clotrimazole that was similar to the one found in the first experiment.

We then determined the effect of clotrimazole on the Cyp17-I protein expression in testes. The analysis revealed that clotrimazole led to a strong increase of Cyp17-I immunoreactivity in interstitial cells (Fig. 4). Image analysis of surfaces labeled by the Cyp17-I antibody normalized to the total surface of testis demonstrated that the increased expression of the Cyp17-I within the testicular tissue was dependent on the concentration of clotrimazole (Fig. 5). At the histological level, spermatogonia type A were observed more frequently in two third of fish exposed to 1.45  $\mu$ M of clotrimazole (Fig. 2S). However, future work has to be done to quantify this effect.

Finally, we assessed the effect of clotrimazole on the circulating 11-KT concentrations. In control fish, the mean concentration of circulating 11-KT was 9.9  $\pm$  4.8 ng/ml (Table 1), which is in accordance with the level measured in zebrafish by Christianson-Heiska et al. [9]. The 7 days exposure to clotrimazole revealed no significant effect on circulating concentration of 11-KT whatever the concentration (Table 1).

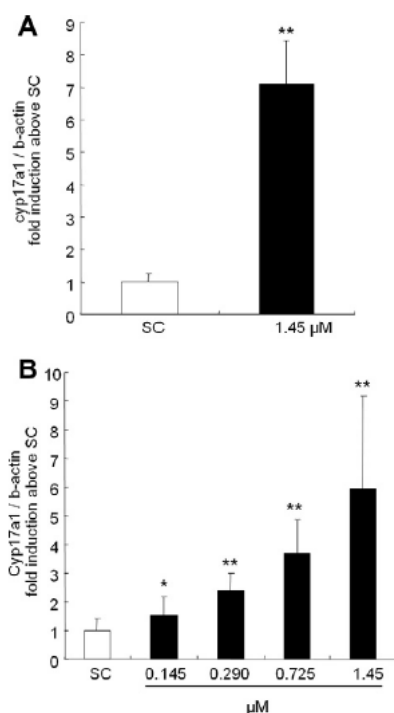
### 3.4. Ex-vivo effect of clotrimazole on *cyp17a1* expression and 11-KT synthesis in a primary testis culture system for zebrafish

To study possible direct effects of clotrimazole on zebrafish testicular *cyp17a1* expression and on the release of 11-KT, an *ex vivo* organ culture system for zebrafish testis was used [24]. In testicular tissue explants exposed *ex vivo* to 1  $\mu$ M of the adenylate cyclase activator FSK (used as a positive control) for 6 days, a significant 3-fold increase of *cyp17a1* mRNA levels has been measured (Fig. 6A). In contrast, clotrimazole (0.2, 1, 5  $\mu$ M) had no effect on *cyp17a1* basal and FSK-induced gene expression in the testis explants culture system (Fig. 6B and C). We showed that 1  $\mu$ M FSK clearly elevated the release of 11-KT into the culture medium from 58  $\pm$  48 pg/ml in controls to 6415  $\pm$  5842 pg/ml in FSK-exposed testes (Fig. 7A). In contrast, a significant inhibition of the 11-KT release *ex vivo* was measured at 5  $\mu$ M of clotrimazole (Fig. 7B). At 1  $\mu$ M, clotrimazole had no effect on the basal 11-KT release (Fig. 7B) while it significantly inhibited the FSK-induced 11-KT release (Fig. 7C).

## 4. Discussion

### 4.1. *Cyp17a1* is predominantly expressed in the gonads of male and female zebrafish at various stages of development

In this study, *cyp17a1* transcripts, as measured by the bDNA assay, were detected in both brain and gonad tissue of male and female zebrafish. These results are in agreement with previously reported *cyp17a1* gene expression measured in brain and gonads by RT-PCR in zebrafish [11,43], fathead minnow [17], catfish [36] as well as in half-smooth tongue sole [7]. In the brain of adult zebrafish, we found that genes encoding the steroidogenic enzymes P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase and P450 aromatase were



**Fig. 3.** Effect of clotrimazole on testicular *cyp17a1* gene expression following a 7 days exposure to clotrimazole. (A) First exposure to a single high concentration of clotrimazole (1.45  $\mu$ M). (B) Second independent exposure to increasing concentrations of clotrimazole (0.145, 0.290, 0.725, 1.45  $\mu$ M). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. N = 10 fish/condition. SC: solvent control. Data were analyzed with Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney U test. \* $p$  < 0.05 vs. SC, \*\* $p$  < 0.01 vs. SC.



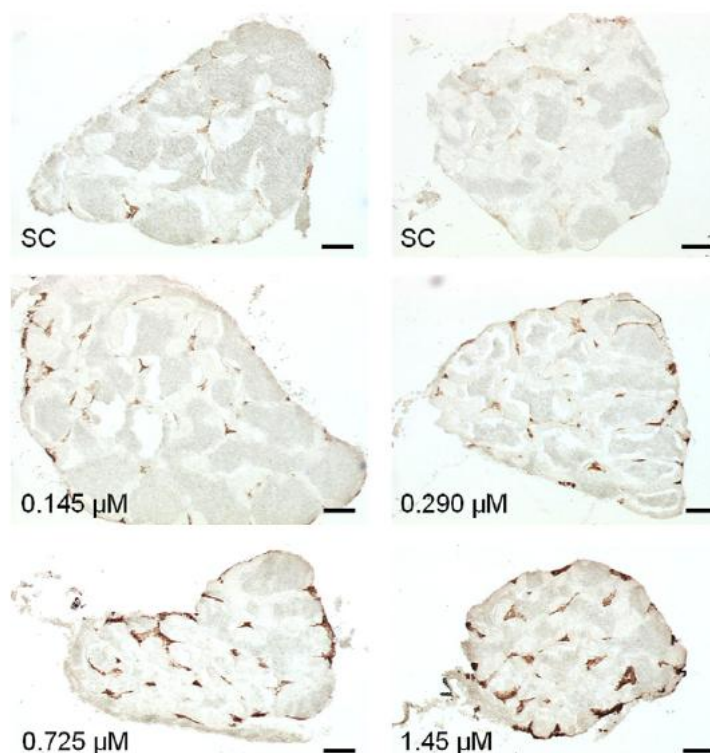


Fig. 4. Effect of clotrimazole (0.145, 0.290, 0.725, 1.45  $\mu$ M) on testicular Cyp17-I protein synthesis following a 7 days exposure assessed by immunohistochemistry. Clotrimazole increased Cyp17-I protein synthesis by interstitial cells.  $N = 5$ –7 fish/condition. SC: solvent control. Scale bars represent 100  $\mu$ m.

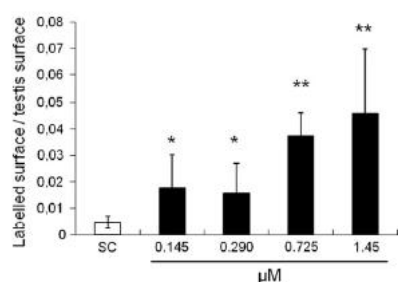


Fig. 5. Analysis of Cyp17-I immunohistochemistry experiments on testis of zebrafish exposed to clotrimazole (0.145, 0.290, 0.725, 1.45  $\mu$ M) for 7 days. Clotrimazole increased the ratio between labeled surface and the total testis surface in a concentration dependent manner.  $N = 5$ –7 fish/condition. Data were analyzed with Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney  $U$  test. \* $p < 0.05$  vs. SC, \*\* $p < 0.01$  vs. SC.

expressed in both genders, without sexual dimorphism. Marked sex differences in expression levels were noticed with much higher levels of *cyp19a1b* as compared to *cyp17a1*. In contrast to mammals, the brain of teleosts is well known for its exceptional capacity to synthesize neuroestrogens that are produced locally in radial glial cells by the P450aromatase B (encoded by *cyp19a1b*), which is not only highly expressed during embryonic development but persists into adulthood [12,42]. Apart from aromatase, little information is available as regards to the expression and activity of other steroidogenic enzymes in the central nervous system (CNS) of fish (for a review see [13]). Nonetheless, the findings of Cyp11a1 (P450

scc), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 $\beta$ -hydroxylase and *cyp17* genes expression found in brain of fish [3,7,11,12,17,36,43, this study] argue for a local synthesis of steroids within the CNS, which is further supported by the finding that zebrafish brain has the ability to convert [3H]-pregnenolone into a variety of radiolabeled steroids [12]. Consistent with previous studies in zebrafish [43] and fathead minnow [17], a predominant expression of the *cyp17a1* gene was found in ovary and testis of adult zebrafish, suggesting that gonads are major expression sites of *cyp17a1*. In the present study, we further identified the localization of the cellular sites of Cyp17-I protein expression in ovary and testis and characterized its expression at different stages of gonad development, using a specific anti-zebrafish Cyp17-I antiserum. In histologically undifferentiated gonads, Cyp17-I protein was not detected. We observed the onset of Cyp17-I expression in 40-dpf old zebrafish, when gonads start differentiating into ovary and presumptive testis. Then, the Cyp17-I protein expression increased markedly between 40 and 60 dpf, notably in testis. At adult stages, Cyp17-I expression was found in follicular cells around oocytes and in interstitial cells in the testis. On the one hand, the localization of expression sites of the Cyp17-I protein in ovary and testis is in agreement with that one reported in zebrafish and rainbow trout by means of immunohistochemistry [10,22], and in medaka and tilapia by means of *in situ* hybridization [45,46]. On the other hand, the expression pattern of Cyp17-I contrasts markedly with that of aromatase (*cyp19a1a*) during gonad development of zebrafish. Indeed, it has been clearly demonstrated that the expression of *cyp19a1a* occurred when the gonads were undifferentiated, and that this expression persisted in the ovary but not in the testis [34]. While down-regulation of

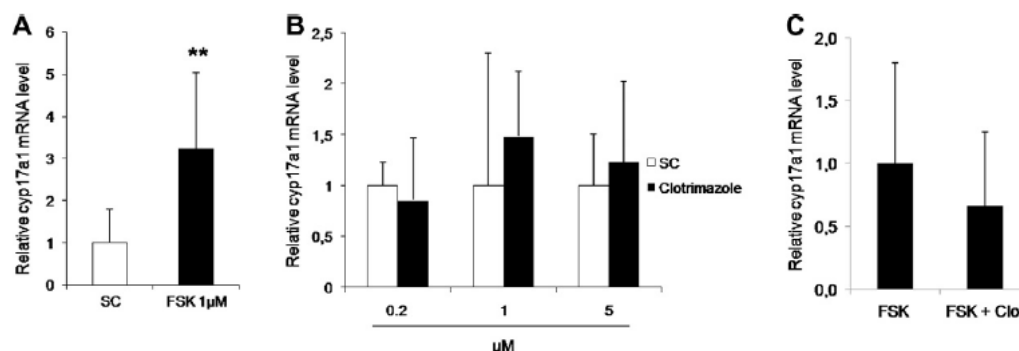


Fig. 6. Effect of forskolin (FSK) 1 μM (A), clotrimazole (B) or a co-exposure to FSK 1 μM and clotrimazole (Clo) 1 μM (C) on testicular *cyp17a1* gene expression after a 6 days *ex vivo* exposure of zebrafish testis explants. Target gene expression was normalized by the expression of the beta-actin gene. SC: solvent control. N = 6–8 pairs of testis per condition. Data were analyzed with a paired t-test. \*\**p* < 0.01 vs. SC.

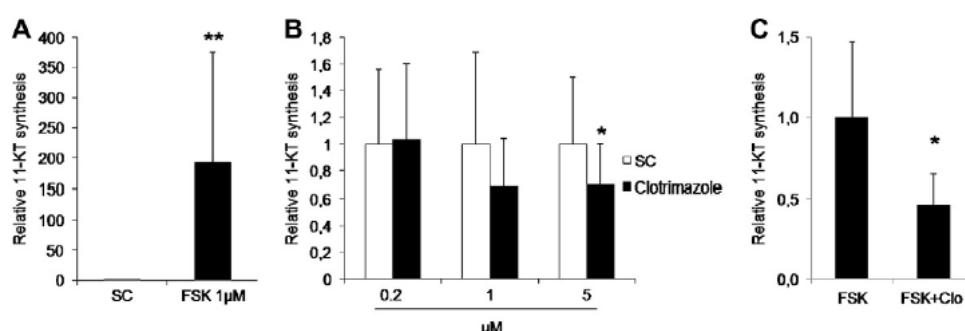


Fig. 7. Effect of forskolin (FSK) 1 μM (A), clotrimazole (B) or a co-exposure to FSK 1 μM + clotrimazole (Clo) 1 μM (C) on testicular 11-ketotestosterone release in the culture medium after 6 days *ex vivo* exposure of zebrafish testis explants. Data are expressed as relative 11-KT release compared to solvent control (SC). N = 6–8 pairs of testis per condition. Data were analyzed with a paired t-test. \**p* < 0.05 vs. SC (A and B) or vs. FSK (C), \*\**p* < 0.01 vs. SC.

*cyp19a1a* appears crucial for testis differentiation in zebrafish [34], our results on Cyp17-I do not support a key role of this enzyme in testis differentiation. Interestingly, in the gonochoristic fish species rainbow trout, it has been found that the *cyp17a1* expression was not sexually dimorphic during early gonad differentiation, in contrast to *cyp19a1a* [41].

#### 4.2. Clotrimazole affects differently the zebrafish testicular steroidogenesis *in vivo* and *ex vivo*

One major objective of our study was to assess the effect of clotrimazole on the testicular expression of the *cyp17a1*. To our knowledge, our results show for the first time that clotrimazole disrupts the expression of a key steroidogenic enzyme in the testes *in vivo* and the release of 11-KT, a specific potent 11-oxygenated androgen in fish, *ex vivo*. These effects measured occurred at nominal concentrations of clotrimazole that are high as compared to the concentrations found in aquatic systems.

*In vivo* exposure to clotrimazole for 7 days caused a strong concentration-dependent up-regulation of expression of the *cyp17a1* gene and Cyp17-I protein in the testis. This suggests that clotrimazole treatment leads to a modulation of *cyp17a1* gene transcription and to *de novo* synthesis of the protein in interstitial cells of the testis. Immunohistochemistry experiments indicated that Cyp17-I increase is related, at least in part, to an increase of the immunolabeled surface and may indicate a hypertrophy or

hyperplasia of Cyp17-I synthesizing cells as previously stated by Ankley et al. [2].

In search of a mechanism explaining the clotrimazole-induced effects at the testicular level, we studied a possible direct action of clotrimazole on testicular *cyp17a1* expression, using a recently developed tissue culture system for zebrafish testis explants [24]. In this *ex vivo* system, forskolin (1 μM) up-regulated *cyp17a1* gene expression and the release of 11-KT in the culture medium, likely as a consequence of up-regulation of *cyp17a1* (and maybe other steroidogenesis-related genes) through the cAMP/PKA pathway [15,24]. In contrast, clotrimazole had no effect on transcription of *cyp17a1*, after 6 days of *ex vivo* exposure. However, it inhibited both basal and FSK-induced biosynthesis of 11-KT, a potent androgen in fish. Previous studies have shown the ability of clotrimazole to inhibit *in vitro* several testicular steroidogenic P450 enzyme activities including 17α-hydroxylase and 17,20-lyase activities [4,35]. Therefore, it is possible that inhibition of 11-KT release *ex vivo* reflects, at least partially, an inhibition of the Cyp17-I enzyme activity by clotrimazole as well as of other enzymes involved in steroid biosynthesis. The measurements of enzymatic activities of cytochromes involved in the biosynthesis of 11-KT would help to clarify the precise mode of action of clotrimazole.

Overall, this study demonstrates marked differential effect of clotrimazole on *cyp17a1* expression and biosynthesis of 11-KT depending on the biological model used. Such differences suggest that the clotrimazole-induced *cyp17a1* gene expression and



protein synthesis are not due to a direct action of clotrimazole on the testes to regulate *cyp17a1* transcription and Cyp17-I protein synthesis. Similar to our study, ketoconazole exposure of fathead minnow increased testicular expression of several steroidogenesis-relevant genes, including *cyp17a1* [2,39]. This increased activity of the steroidogenic system has been interpreted as a compensatory response of the feedback loop to the hypothalamus-pituitary level [1,2] to the fungicide-mediated inhibition of the enzyme activities. However, a direct mechanistic link has not been established yet [39]. Such compensatory response might explain the absence of effect on circulating concentrations of 11-KT after *in vivo* exposure to clotrimazole that we observed in this study. Circulating levels of 11-KT result from the ability of clotrimazole to modulate cytochrome P450 enzymatic activity, including those involved in steroid synthesis [4,28,35] as well as those involved in steroid catabolism in fish [31]. Therefore, clotrimazole is expected to strongly affect several key steps of the metabolism of steroid hormones (biosynthesis, excretion and elimination) along the hypothalamus-pituitary-gonad axis, hence making difficult to predict the *in vivo* effect of this compound on circulating concentrations of 11-KT.

In addition, bioavailability and/or biotransformation of clotrimazole may vary *in vivo* and *ex vivo*, thus influencing its effect on target tissues. To our knowledge, no information is available on clotrimazole metabolism in fish but in rat, it has been shown that radiolabeled clotrimazole is rapidly metabolized and eliminated [14]. Cross-species comparisons of several conazole fungicide hepatic metabolites indicate a high degree of conservation among species [25]. Antifungal azoles are known to modulate expression and activities of various hepatic phase I (Cyp1A, CYP3A) and phase II (glutathione S-transferase) biotransformation enzymes in mammals [4,16,35] and fish [18,29]. In full-grown post-vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout incubated *in vitro* with prochloraz, both *cyp1a* and *cyp3a* expressions were up-regulated [32]. Thus, it would be of interest to better characterize the xenobiotic biotransformation capacity of testicular tissue explants and also to compare metabolic transformation pathways of clotrimazole among *in vivo* and *ex vivo* bio-assays in order to determine to which extent it can explain the pattern of responses observed on testicular steroidogenesis in the model used.

## 5. Conclusion

Our study provides new and relevant data on the expression of *cyp17a1* in the zebrafish, notably by characterizing the spatio-temporal expression of Cyp17-I protein during gonad development. Further, we demonstrated for the first time the *in vivo* perturbation of transcription and protein synthesis of *cyp17a1* in testicular tissue of zebrafish exposed to clotrimazole. The marked differences observed between *in vivo* and *ex vivo* experiments suggest that clotrimazole does not act directly on testes to regulate *cyp17a1* transcription and protein synthesis, thus raising the need to conduct further work to explore the mechanisms of action of clotrimazole on steroidogenesis. In any case, using the testis tissue explant model, we did demonstrate a direct action of clotrimazole on the gonad resulting in an inhibition of 11-KT release. All together, these novel data deserve further studies on the mechanisms of action and effects of azole fungicides on gonadal steroidogenesis and their consequences on the reproductive physiology of fish to assess their ecotoxicological risks.

## Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

## Acknowledgments

The authors express their acknowledgments to Dr. Alexis Fostier (INRA-Scribe, Rennes, France) for his critical reading and comments on the manuscript. We thank Emmanuelle Maillot-Maréchal and Benjamin Piccini (INERIS) for their excellent technical help in conducting laboratory exposures. This study was supported by the post-Grenelle P189-NEMO and Grant P189-DRC01-07 of the French Ministry of Ecology and Sustainable Development.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ygcen.2011.09.008.

## References

- [1] G.T. Ankley, D.C. Bencic, J.E. Cavallin, K.M. Jensen, M.D. Kahl, E.A. Makynen, D. Martinovic, N.D. Mueller, L.C. Wehmas, D.L. Villeneuve, Dynamic nature of alterations in the endocrine system of fathead minnows exposed to the fungicide prochloraz, *Toxicol. Sci.* 112 (2009) 344–353.
- [2] G.T. Ankley, K.M. Jensen, M.D. Kahl, E.A. Makynen, L.S. Blake, K.J. Greene, R.D. Johnson, D.L. Villeneuve, Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): reproductive toxicity and biological compensation, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 1214–1223.
- [3] A.S. Arterbery, D.L. Deitcher, A.H. Bass, Divergent expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 11beta-hydroxylase genes between male morphs in the central nervous system, sonic muscle and testis of a vocal fish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 167 (2010) 44–50.
- [4] M. Ayub, M.J. Levell, Inhibition of testicular 17 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase but not 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase or 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase by ketoconazole and other imidazole drugs, *J. Steroid Biochem.* 28 (1987) 521–531.
- [5] N. Berenzen, A. Lentzen-Godding, M. Probst, H. Schulz, R. Schulz, M. Liess, A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level, *Chemosphere* 58 (2005) 683–691.
- [6] A.R. Brown, L.K. Bickley, G. Le Page, D.J. Hosken, G.C. Paull, P.B. Hamilton, S.F. Owen, J. Robinson, A.D. Sharpe, C.R. Tyler, Are toxicological responses in laboratory (inbred) zebrafish representative of those in outbred (wild) populations? – a case study with an endocrine disrupting chemical, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 4166–4172.
- [7] C.F. Chen, H.S. Wen, Z.P. Wang, F. He, J.R. Zhang, X.Y. Chen, G.X. Jin, B. Shi, D. Shi, Y.P. Yang, J.F. Li, B.X. Qi, N. Li, Cloning and expression of P450c17-1 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in brain and ovary during gonad development in *Cynoglossus semilaevis*, *Fish. Physiol. Biochem.* 36 (2010) 1001–1012.
- [8] K. Cheshenko, F. Pakdel, H. Segner, O. Kah, R.L. Eggen, Interference of endocrinedisrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 155 (2008) 31–62.
- [9] I. Christianson-Heiska, P. Smeds, N. Granholm, E. Bergelin, B. Isomaa, Endocrine modulating actions of a phytosterol mixture and its oxidation products in zebrafish (*Danio rerio*), *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 145 (2007) 518–527.
- [10] P.P. de Waal, M.C. Leal, A. Garcia-Lopez, S. Liarte, H. de Jonge, N. Hinfray, F. Brion, R.W. Schulz, J. Bogerd, Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis, *J. Endocrinol.* 202 (2009) 287–297.
- [11] J. Deng, C. Liu, L. Yu, B. Zhou, Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243 (2010) 87–95.
- [12] N. Diotel, J.L. Do Rego, I. Anglade, C. Vaillant, E. Pellegrini, M.M. Gueguen, S. Mironov, H. Vaudry, O. Kah, Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish, *Eur. J. Neurosci.* 34 (2011) 45–56.
- [13] N. Diotel, Y.L. Page, K. Mouriec, S.-K. Tong, E. Pellegrini, C. Vaillant, I. Anglade, F. Brion, F. Pakdel, B.-c. Chung, O. Kah, Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions, *Front. Neuroendocrinol.* 31 (2010) 172–192.
- [14] B. Duhm, H. Medenwald, J. Puetter, W. Maul, K. Patzschke, L.A. Wegner, The pharmacokinetics of clotrimazole 14C, *Postgrad. Med. J.* 50 (Suppl 1) (1974) 13–16.
- [15] A. Garcia-Lopez, H. de Jonge, R.H. Nobrega, P.P. de Waal, W. van Dijk, W. Hemrika, G.L. Taranger, J. Bogerd, R.W. Schulz, Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins, *Endocrinology* 151 (2009) 2349–2360.
- [16] P. Gonzalez, M.J. Tunon, V. Manrique, L.A. Garcia-Pardo, J. Gonzalez, Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase enzymes induced by clotrimazole treatment in rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 16 (1989) 867–871.

- [17] S. Halm, J.Y. Kwon, M. Rand-Weaver, J.P. Sumpter, N. Pounds, T.H. Hutchinson, C.R. Tyler, Cloning and gene expression of P450 17[alpha]-hydroxylase, 17, 20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 130 (2003) 256–266.
- [18] L. Hasselberg, S. Westerberg, B. Wassmur, M.C. Celander, Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17[alpha]-ethynylestradiol exposure, *Aquat. Toxicol.* 86 (2008) 256–264.
- [19] N. Hinfray, O. Palluel, C. Turies, C. Cousin, J.M. Porcher, F. Brion, Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*), *Environ. Toxicol.* 21 (2006) 332–337.
- [20] N. Hinfray, J.M. Porcher, F. Brion, 1 Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 144 (2006) 252–262.
- [21] M. Kahle, I.J. Buerge, A. Hauser, M.D. Muller, T. Poiger, Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 7193–7200.
- [22] T. Kobayashi, M. Nakamura, H. Kajiuura-Kobayashi, G. Young, Y. Nagahama, Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, P450<sub>arom</sub>, and 3beta-HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Cell Tissue Res.* 292 (1998) 573–577.
- [23] J. Kreuger, Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996, *Sci. Total Environ.* 216 (1998) 227–251.
- [24] M.C. Leal, P.P. de Waal, Á. García-López, S.X. Chen, J. Bogerd, R.W. Schulz, Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo, *Gen. Comp. Endocrinol.* 162 (2009) 134–138.
- [25] C.S. Mazur, J.F. Kenneke, Cross-species comparison of conazole fungicide metabolites using rat and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic microsomes and purified human CYP 3A4, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 947–954.
- [26] A.T. McCurley, G.V. Callard, Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male–female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment, *BMC Mol. Biol.* 9 (2008) 102.
- [27] A. Menuet, E. Pellegrini, F. Brion, M.M. Gueguen, I. Anglade, F. Pakdel, O. Kah, Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene, *J. Comp. Neurol.* 485 (2005) 304–320.
- [28] G. Monod, A. De Mones, A. Fostier, Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol suppression by imidazole fungicides in rainbow trout, *Mar. Environ. Res.* 35 (1993) 153–157.
- [29] J.M. Navas, A. Chana, B. Herradon, H. Segner, Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives, *Life Sci.* 76 (2004) 699–714.
- [30] M. Peschka, P.H. Roberts, T.P. Knepper, Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 959–968.
- [31] R. Petkam, R.L. Renaud, J.F. Leatherland, The role of CYP 1A1 in the in vitro metabolism of pregnenolone by the liver of rainbow trout embryos, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 135 (2003) 277–284.
- [32] H. Rime, T. Nguyen, J. Bobe, A. Fostier, G. Monod, Prochloraz-induced oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), A molecular and functional analysis, *Toxicol Sci* 118 (2010) 61–70.
- [33] P.H. Roberts, K.V. Thomas, The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Sci. Total Environ.* 356 (2006) 143–153.
- [34] A. Rodríguez-Mari, Y.-L. Yan, R.A. BreMiller, C. Wilson, C. Canestro, J.H. Postlethwait, Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, During gonad development, *Gene Expr Patterns* 5 (2005) 655–667.
- [35] I. Schuster, The interaction of representative members from two classes of antimycotics – the azoles and the allylamines – with cytochromes P-450 in steroidogenic tissues and liver, *Xenobiotica* 15 (1985) 529–546.
- [36] G. Sreenivasulu, B. Senthilkumar, A role for cytochrome P450 17[alpha]-hydroxylase/c17–20 lyase during shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 115 (2009) 77–85.
- [37] K.V. Thomas, M.J. Hilton, The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries, *Mar. Pollut. Bull.* 49 (2004) 436–444.
- [38] C.R. Tyler, S. Jobling, J.P. Sumpter, Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 319–361.
- [39] D.L. Villeneuve, L.S. Blake, J.D. Brodin, K.J. Greene, I. Knoebel, A.L. Miracle, D. Martynovic, G.T. Ankley, Transcription of key genes regulating gonadal steroidogenesis in control and ketoconazole- or vinclozolin-exposed fathead minnows, *Toxicol. Sci.* 98 (2007) 395–407.
- [40] A.M. Vinggaard, C. Hnida, V. Breinholt, J.C. Larsen, Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 227–234.
- [41] D. Vizziano, G. Randuineau, D. Baron, C. Cauty, Y. Guiguen, Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Dev. Dyn.* 236 (2007) 2198–2206.
- [42] M. Vosges, Y. Le Page, B.C. Chung, Y. Combarrous, J.M. Porcher, O. Kah, F. Brion, 17alpha-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish, *Aquat. Toxicol.* 99 (2010) 479–491.
- [43] Y. Wang, W. Ge, Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17[alpha]-hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extragonadal tissues, *Gen. Comp. Endocrinol.* 135 (2004) 241–249.
- [44] H. Yu, H. Cheng, Y. Guo, L. Xia, R. Zhou, Alternative splicing and differential expression of P450c17 (CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (2003) 165–171.
- [45] L.Y. Zhou, D.S. Wang, T. Kobayashi, A. Yano, B. Paul-Prasanth, A. Suzuki, F. Sakai, Y. Nagahama, A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney, *Endocrinology* 148 (2007) 4282–4291.
- [46] L.Y. Zhou, D.S. Wang, Y. Shibata, B. Paul-Prasanth, A. Suzuki, Y. Nagahama, Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 619–625.

## **Chapitre II : Effets du clotrimazole sur l'axe hypophyse-gonade chez le poisson zèbre adulte: l'induction de la stéroïdogénèse par le clotrimazole implique la voie Fsh/Fshr**

### Contexte

Le clotrimazole est connu pour inhiber des activités enzymatiques cytochrome P450, dont plusieurs sont impliquées dans la stéroïdogénèse, comme démontré dans des tests *in vitro* sur des modèles poissons (Hinfray et al., 2006; Vinggaard *et al.*, 2006). Dans l'article 1, nous avons montré que le clotrimazole est capable de moduler *in vivo* la stéroïdogénèse en stimulant l'expression du gène *cyp17a1* et de la synthèse de la protéine Cyp17a1. En revanche, le mécanisme d'action permettant d'expliquer cette induction est encore mal compris mais pourrait faire intervenir un rétrocontrôle au niveau central. Chez les vertébrés, la stéroïdogénèse gonadique est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les hormones pituitaires LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle- Stimulating Hormone) régulent la stéroïdogénèse et la gamétogénèse en interagissant avec leurs récepteurs gonadiques. En retour, les hormones stéroïdiennes induisent des rétrocontrôles sur les circuits neuroendocriniens (Zohar et al., 2010).

### Objectif et démarche expérimentale

Dans ce contexte, le but de l'étude est (1) d'évaluer les effets du clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire et (2) de caractériser son mode d'action en étudiant un réseau de gènes fonctionnels le long de l'axe hypophyse-gonade. Dans ce but, les poissons sont exposés 7 jours au clotrimazole (71 - 258 µg/L).

Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé

**« Rôle clef de la Fsh comme médiatrice de l'effet du clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire du poisson zèbre adulte »** rédigé en anglais et accepté pour publication dans Toxicology (Article 2)

Damien Baudiffier, Nathalie Hinfray, Mélanie Vosges, Nicolas Creusot, Edith Chadili, Jean-Marc Porcher, Rüdiger W. Schulz, François Brion ; Toxicology, 2012

### Résultats principaux (article 2) :

Nous avons montré que le clotrimazole induit l'expression de gènes et la synthèse d'enzymes impliquées dans le processus de la stéroïdogénèse *in vivo*. Les expressions de *star*, *cyp17a1* et *cyp11c1* sont induites et fortement corrélées entre elles. En accord avec ces résultats, le clotrimazole induit la synthèse des protéines enzymatiques Cyp17a1 et Cyp11c1 dans les cellules de Leydig. En revanche, les concentrations en 11-KT circulantes ne sont pas affectées.

Par ailleurs, l'analyse du réseau de gènes clefs de l'axe hypophyse- gonade permet de conclure que l'induction des enzymes de la stéroïdogénèse par le clotrimazole passe probablement par la voie de signalisation Fsh/FshR. En effet, une induction de l'expression de *fshβ* au niveau hypophysaire et de son récepteur *fshr* au niveau gonadique est observée. De plus, l'expression du *fshr* est corrélée à l'expression des gènes de la stéroïdogénèse dans les groupes exposés au clotrimazole. Enfin, l'expression de l'insulin-like growth factor 3 (*igf3*), un gène spécifiquement exprimé dans les cellules de Sertoli et connu pour être régulé positivement par la Fsh (Nobrega, Morais, de Waal, Bogerd and Schulz; données non publiées), est stimulée par une exposition au clotrimazole. L'ensemble de ces données suggère que la voie de signalisation Fsh/FshR est probablement impliquée dans les modifications de la physiologie testiculaire induite par le clotrimazole. Au niveau sanguin, on constate un maintien des niveaux circulants de 11-KT après une exposition de 7 jours au clotrimazole qui résultent d'une compensation biologique. Si l'inhibition directe d'une ou plusieurs activités enzymatiques est suivie dans un premier temps d'une diminution de la concentration en 11-KT plasmatique, celle-ci, du fait de la stimulation de la synthèse de Fsh est, dans un second temps, compensée. L'équilibre entre l'inhibition des activités enzymatiques et l'induction de l'expression des gènes cibles aboutirait au final à une absence de variation détectable de la concentration en 11-KT quand elle est mesurée après 7 jours d'exposition.

### Résultats complémentaires

Les résultats de l'article suggèrent que la stimulation *in vivo* de la stéroïdogénèse via la voie de signalisation Fsh /FshR compensent les effets inhibiteurs primaires directs du clotrimazole au niveau d'une ou plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse. La stimulation de

l'expression de *fshβ* peut être due à une levée du rétro- contrôle négatif de la 11-KT au niveau hypophysaire, ceci faisant suite à une diminution à court terme des niveaux circulants de 11-KT. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une action directe du clotrimazole sur l'hypophyse ou l'hypothalamus. Pour tenter de répondre en partie à ces questions, une lignée cellulaire gonadotrope LbT2 a été utilisée. Cette lignée est composée de cellules de souris portant notamment une région de régulation de la sous-unité beta du LH de rat reliée à l'antigène T du SV-40 (Turgeon *et al.*, 1996). Les expérimentations menées sur cette lignée ont été réalisées par l'équipe « Physiologie de l'Axe Gonadotrope » (CNRS EAC 4413) qui participent à un programme sur les effets neuroendocriniens des PE (NEED<sup>1</sup>). Cette lignée fonctionnelle est capable de répondre à la GnRH mais aucun effet n'a été observé sur la sécrétion de LH et de FSH, ni sur l'expression des gènes codant pour les sous unités β de ces gonadotropines après 4h et 24h d'exposition au clotrimazole (0,01 – 1 μM) dans un milieu supplémenté ou non en activine (données non montrées). Sur ces lignées spécifiques, il n'y a pas donc pas d'effet direct du clotrimazole sur l'expression des gonadotropines et leur sécrétion. Bien que ces données doivent être prises avec précaution du fait de l'utilisation d'un tout autre modèle biologique que le nôtre, elles sont plutôt en accord avec notre hypothèse selon laquelle l'induction de l'expression des gènes codant pour les gonadotropines *lhβ* et *fshβ* au niveau hypophysaire et de leurs récepteurs au niveau testiculaire chez le poisson zèbre est une réponse de compensation face à l'action inhibitrice du clotrimazole sur l'activité d'une ou plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse. Par ailleurs, de la même manière que les travaux réalisés sur l'hypophyse, il aurait pu être envisagé de tester l'hypothèse d'une action directe ou indirecte (réponse secondaire à une inhibition de la synthèse de stéroïdes sexuels) du clotrimazole sur les neurones à GnRH, qui vont confluer au niveau de l'hypothalamus pour réguler la synthèse et la libération des gonadotropines au niveau hypophysaire. Concernant l'hypothèse d'une réponse secondaire suite à l'inhibition d'une ou plusieurs activités enzymatiques de la stéroïdogénèse, elle a été testée en mesurant l'expression du variant hypophysiotrope *gnrh3* dans le cerveau (voir **chapitre 3**).

## Conclusions

En étudiant un réseau de gènes fonctionnels le long de l'axe hypophyse-gonade, nous avons démontré que le clotrimazole induit une cascade d'événements moléculaires et cellulaires au niveau hypophysaire et testiculaire qui est compatible avec un rôle central de la Fsh dans (1)

<sup>1</sup>programme Neuroendocrine Effect of Endocrine Disruptors, financé par l'agence Nationale pour la recherche (ANR)

la stimulation de la stéroïdogénèse des cellules de Leydig pour compenser l'action inhibitrice du clotrimazole sur la synthèse de 11-KT et (2) dans l'induction de l'expression du gène *igf3* dans les cellules de Sertoli. L'étude de ce réseau de gènes apparaît donc utile et pertinent pour caractériser le mode d'action du clotrimazole et permet de démontrer que cette molécule amorce une réponse compensatoire de l'axe HPG. La perturbation de cet axe aboutissant à la modulation de la stéroïdogénèse testiculaire soulève donc des questions concernant l'impact du clotrimazole sur la reproduction.





## A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish

Damien Baudiffier<sup>a</sup>, Nathalie Hinfray<sup>a</sup>, Mélanie Vosges<sup>a</sup>, Nicolas Creusot<sup>a</sup>, Edith Chadili<sup>a</sup>, Jean-Marc Porcher<sup>a</sup>, Rüdiger W. Schulz<sup>b</sup>, François Brion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de l'environnement industriel et des risques (INERIS), Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>b</sup> University of Utrecht, Science Faculty, Department Biology, Division Developmental Biology, Reproductive Biology Group, Kruyt Building room W-606, Padualaan 8, NL-3584 CH Utrecht, The Netherlands

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 February 2012

Received in revised form 3 April 2012

Accepted 21 April 2012

Available online 28 April 2012

#### Keywords:

Zebrafish

Clotrimazole

Pituitary-testis axis

Steroidogenesis

### ABSTRACT

Clotrimazole is a pharmaceutical fungicide known to inhibit several cytochrome P450 enzyme activities, including several steroidogenic enzymes. This study aimed to assess short-term *in vivo* effects of clotrimazole exposure on blood 11-ketotestosterone (11-KT) levels and on the transcriptional activity of genes in pituitary and testis tissue that are functionally relevant for androgen production with the view to further characterize the mode of action of clotrimazole on the hypothalamus-pituitary-gonad axis in zebrafish, a model vertebrate in toxicology. Adult male zebrafish were exposed to measured concentrations in water of 71, 159 and 258 µg/L of clotrimazole for 7 days. Expression of pituitary gonadotropins β subunit (*lhb*, *fshb*), testicular gonadotropins receptors (*lhcr*, *fshr*) and testicular steroidogenesis-related genes (e.g., *star*, *cyp17a1*, *cyp11c1*) were assessed. Blood concentrations of 11-KT were measured. Short-term exposure to clotrimazole induced a concentration-dependent increase of *star*, *cyp17a1*, and *cyp11c1* gene expression and Cyp17a1 and Cy11c1 protein synthesis in Leydig cells, but androgen levels in blood remained unchanged. *fshb*, but not *lhb* mRNA levels in the pituitary tended to increase in clotrimazole-exposed zebrafish. Testicular expression of the Fsh receptor gene was significantly up-regulated following exposure, when expression of this receptor was significantly correlated to the expression of steroidogenesis-related genes. Moreover, the Fsh-regulated insulin-like growth factor 3 (*igf3*) gene, a fish-specific Igf peptide expressed in Sertoli cells, was induced in testes. By using a network of genes functioning in pituitary and testis tissue, our study demonstrated that clotrimazole induced a cascade of molecular and cellular events which are in agreement with a role for Fsh (1) in stimulating Leydig cell steroidogenesis to compensate the inhibitory action of clotrimazole on 11-KT synthesis and (2) in inducing the expression of Fsh-regulated *igf3* in Sertoli cells.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Steroidogenesis is a multi-step process consisting of a series of enzymatic reactions that convert cholesterol to biologically active steroid hormones (Miller, 1988; Parker and Schimmer, 1995) that control a large array of important physiological functions (Miller, 1988). In vertebrates, gonadal steroidogenesis is under the control of the hypothalamus-pituitary-gonad (HPG) axis. The hypothalamus secretes gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) that interact with their pituitary receptors (GnRH-Rs) to control synthesis and release of gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) (Burns and Matzuk, 2002).

Gonadotropins control steroidogenesis and gametogenesis through interaction with their gonadal G protein-coupled receptors, FSH receptor (FSHR) and LH receptor (LHR). Androgen production in the testis takes place in the steroidogenic Leydig cells that are situated between the seminiferous tubules close to blood vessels in the interstitial tissue of the testis. The regulation of Leydig cell androgen production is a typical domain of LH in all vertebrates. However, in fish, Leydig cells are also expressing the *fshr* gene and piscine Fshs have been shown to be potent steroidogenic hormones in several species (Garcia-Lopez et al., 2009, 2010; Ohta et al., 2007; Zmora et al., 2007). Hence, in fish Fsh is involved in regulating both, spermatogenesis and steroidogenesis via the Fshr-expressing Sertoli and Leydig cells, respectively (Garcia-Lopez et al., 2009, 2010; Ohta et al., 2007; Schulz et al., 2010). Steroid hormones, in turn, exert positive or negative feedback on neuroendocrine circuits (Dopamine, GABA and GnRH neurons) that control the synthesis and release of gonadotropins (Zohar et al., 2010).

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 44 55 65 12; fax: +33 3 44 55 66 05.  
E-mail address: [francois.brion@ineris.fr](mailto:francois.brion@ineris.fr) (F. Brion).

Several chemical compounds belonging to the azole family alter gonadal steroidogenesis in fish leading to reproductive impairments (Ankley et al., 2007; Villeneuve et al., 2007a; Zhang et al., 2008). These compounds were designed to inhibit a cytochrome P450 (CYP) enzyme involved in ergosterol synthesis of fungi (Henry and Sisler, 1984). However, they can also inhibit other CYP enzyme activities, including steroidogenic cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) and aromatase (CYP19) in mammals and fish (Ayub and Levell, 1987a,b; Heneweer et al., 2004; Hinfray et al., 2006; Monod et al., 1993; Vinggaard et al., 2000). In addition, azole compounds have been shown to interact with different cytoplasmic or nuclear receptors such as aryl hydrocarbon receptor (Navas et al., 2004), pregnane X receptor (Lemaire et al., 2004; Moore and Kliewer, 2000) or androgen receptor (Eil, 1992; Lemaire et al., 2004; Moore and Kliewer, 2000; Navas et al., 2004; Vinggaard et al., 2002) and therefore can interfere with a broad range of physiological processes.

*In vivo* exposure of fish to prochloraz, ketoconazole or clotrimazole increased expression of steroidogenic genes in gonads (Ankley et al., 2007; Villeneuve et al., 2007a; Zhang et al., 2008). Recently, we have reported that in adult zebrafish clotrimazole affected testicular steroidogenesis differently *in vivo* as compared to an *ex vivo* testis tissue explant culture system (Hinfray et al., 2011). The data suggested that clotrimazole-induced 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase (*cyp17a1*) expression was not due to a direct action on the testes to regulate *cyp17a1* transcription but could involve indirect actions at the pituitary level that may then alter the regulation of testicular steroidogenesis. Azoles are known to cause, directly and/or indirectly, endocrine disruption thereby affecting gene expression along the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis (e.g., Liu et al., 2011; Skolness et al., 2011; Zhang et al., 2008). However, the precise mechanism responsible for stimulating gonadal steroidogenesis has not been fully established yet.

In the present study we used zebrafish as a relevant model vertebrate for toxicology (Hill et al., 2005; Sipes et al., 2011) to investigate clotrimazole mode of action. Indeed, in addition to practicalities (small size, low cost, high fecundity, etc.), zebrafish physiology, genetics, and development under “normal conditions” have been studied in great detail and the species has also been used to investigate several types of toxicity from vascular toxicity to endocrine disruption (Sipes et al., 2011). For toxicology, advances in zebrafish genetics and genomics provide useful tools to investigate molecular mechanisms of toxicity of chemicals. Furthermore, conserved cell signaling pathways and development process between zebrafish and mammals, and global concordance between zebrafish and mammalian toxicity studies showed that the zebrafish model could be representative also for higher vertebrates (Sipes et al., 2011).

The aim of this work was therefore to assess the *in vivo* effect of short-term exposure to clotrimazole on androgen levels in blood and on the transcriptional activity of genes in pituitary and testes that are functionally relevant for androgen production (i) to characterize the mode of action of clotrimazole on the HPG axis and (ii) to investigate a potential role of gonadotropins in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis. For that purpose, male fish were exposed for 7 days to clotrimazole (71–258  $\mu$ g/L). The rationale for choosing these concentrations was based on previous experiments that showed up-regulation of *cyp17a1* gene expression in zebrafish testis after 7 days of exposure to clotrimazole (Hinfray et al., 2011). These are higher concentrations than those recently reported in waste water treatment plants (e.g., Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011; Lacey et al., 2012). In the pituitary, changes in *lhb* and *fshb* transcript levels were measured. In testis tissue, expression of steroidogenic acute regulatory protein (*star*); hydroxyl- $\Delta$ -5-steroid dehydrogenase, 3 $\beta$ - and steroid  $\Delta$ -isomerase 1 (*hsd3b1*); cytochrome P450,

family 17, subfamily A polypeptide 1 (*cyp17a1*); cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1 showing a 11 $\beta$ -hydroxylase activity (*cyp11c1*; previously referred to as *cyp11b2*); hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 3a (*hsd11b3a*); cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a (*cyp19a1a*); luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (*lhgr*); follicle stimulating hormone receptor (*fshr*); were quantified. The Sertoli cell markers insulin-like growth factor 3 (*igf3*) and anti-müllerian hormone (*amh*) as well as the spermatogonial marker piwi-like 1 (*piwil1*, previously referred to as *ziwi*) were also assessed.

## 2. Methods

### 2.1. Animals and treatments

The ethical committee of the National Institute of Industrial Environment and Risks (INERIS) approved all experiments. Mature wild type male zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were obtained from our breeding unit. Fish were raised under controlled photoperiod (14 h light/10 h dark cycle) in a recirculated water system (Techniplast, France) at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . They were fed with TetraMin Pro® twice a day and live brine shrimp (*Artemia* spp.; Ocean Nutrition). Clotrimazole (CLO) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and all the stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich).

Adult male zebrafish were exposed to three concentrations of clotrimazole or solvent alone (DMSO, 0.004% v:v) for 7 days under semi-static conditions with a total renewal of the water every 24 h. Each group contained 20 fish equally distributed in two replicate 41-L glass tanks. Water samples were collected from each condition at day 5 at  $t = 0$  h and  $t = 24$  h before renewal of water.

### 2.2. Fish sampling

At the end of the exposure, fish were sacrificed in ice-cold water, measured and weighed. Blood (2.5 or 5  $\mu$ L) was collected by cardiac puncture for each fish with a heparinized syringe (1000 U of heparin per mL) and transferred into Eppendorf tubes (held on ice) containing enzyme immunoassay (EIA) buffer supplemented with proteinase inhibitor phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF, 1 mM) and heparin (1000 U/mL). Blood was diluted 1:10 (v:v) in this solution. Then, blood was vortexed, centrifuged (3000 g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Liver and pituitary were removed and preserved in RNA later™ (Sigma-Aldrich, France) at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Testes were removed and preserved in RNA later™ (Sigma-Aldrich, France) at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis or fixed in Bouin's fluid. Testis weight was determined to calculate the gonado-somatic index (GSI, gonad wet weight/total body wet weight  $\times 100$ ).

### 2.3. Analytical chemistry for clotrimazole actual concentrations determination

Clotrimazole concentrations in exposure tanks were determined using solid phase extraction (SPE) followed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to UV-Vis detection ( $\lambda = 194$  nm). The extraction protocol was adapted from (Peschka et al., 2007). Briefly, water samples were collected from tanks (250 mL per condition) and adjusted to pH of 2. Then, samples were filtered under vacuum through SPE cartridges (Waters® OASIS-HLB, 6cc, 200 mg). Prior to extraction, the cartridges were conditioned with 6 mL of *n*-heptane, 6 mL of methanol, and 5 mL of ultrapure water (pH 2). After drying under vacuum for 90 min, clotrimazole was eluted with  $3 \times 1.5$  mL of acetone. Finally, acetone extracts were evaporated to dryness under nitrogen gas and residues were redissolved in 1 mL of acetonitrile. Samples were analyzed using a Varian® HPLC system (Prostar 230 ternary pump, Prostar 420 autosampler, Prostar 9050 UV-Vis detector) based on a C18 column (Poursuit C18, 5  $\mu$ M,  $250 \times 4.6$  d.i., Varian®). Actual clotrimazole concentrations in exposure tanks have been determined using external calibration based on four points calibration curve (0 to 100  $\mu$ g/L). The limit of detection (LOD), obtained with signal/noise ratios equal to 3, was 1.5  $\mu$ g/L. For each experiment, a 20  $\mu$ g/L clotrimazole-spiked has been processed as quality control of the extraction procedure. The recovery of clotrimazole was higher than 90% in all the experiment.

### 2.4. Gene expression analysis

Total RNA was extracted from testis or pituitary using Trizol Reagent (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) following manufacturer's instructions by using a fast tissue homogenizer (Precellys 24). The mRNA quality was verified with a 1% agarose gel electrophoresis stained with Sybr Safe (Invitrogen). For each sample, the total RNA concentration was quantified using a Nanodrop ND-8000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and the samples were diluted to 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L. DNA for the real-time PCR reactions was generated using a combination of random hexamers, M-MLV reverse transcriptase, 2.5 mM dNTP and RNasin to avoid RNA degradation. The expression of target genes was analyzed using an Eppendorf realplex4 Mastercycler epgradient 5 (Eppendorf, France). Standard curves from  $10^{-4}$



to  $10^{-11}$  µg/µL were created for each gene to determine the PCR efficiency and to obtain concentrations in µg/µL for each sample. Dilution of standards, mRNA and cDNA samples were prepared in RNase-free water (Sigma–Aldrich). Every 25-µL cDNA amplification reaction contained 5 µL of diluted sample or standard, 15 µL of QuantiTect Sybr Green Mix (Qiagen, France) and 2 µL of each 400 nM forward and 400 nM reverse primers. Primer sequences are presented in the Table S1. The real-time PCR program included an enzyme activation step at 95 °C (15 min) and 40 cycles of 95 °C (5 s), 60 °C (30 s) and 72 °C (30 s). Determination of transcript abundance of genes was conducted in duplicate.

Normalization to total RNA in association with calibration to a gene-specific mRNA standard curve was employed in testes and pituitaries rather than normalization to “housekeeping” genes. Indeed, when we assayed “housekeeping” genes (*gapdh* and *elf1a*), we observed significant changes between treatments (data not shown). We assume that both normalization to “housekeeping” gene and to total RNA have limitations when changes in tissue composition occur in response to an exposure (Arukwe, 2006; Huggett et al., 2005; Villeneuve et al., 2007a) and “housekeeping” genes often simply rely on normalization to total RNA (Arukwe, 2006; Huggett et al., 2005).

## 2.5. Fluorescent immunohistochemistry

The antiserum raised against zebrafish Cyp17a1 has been described previously (Hinfray et al., 2011). The antiserum against Cyp11c1 was a generous gift of Yann Guiguen (INRA-Scribe, Rennes, France). The antiserum was produced in rats by co-injection of two synthetic peptides of the rainbow trout Cyp11c1 sequence (EMBL accession number: Q918S6). The first peptide (PWATHRETRQHSKGV) showed 93% identity with the zebrafish Cyp11c1 protein sequence (EMBL accession number: Q0P493) while no sequence identity was found between the second rainbow trout peptide (EKDGGKEERGHSLT) and the zebrafish Cyp11c1 amino-acids sequence.

At the end of exposure, testes were fixed in Bouin's fluid for 48 h at 4 °C. After fixation, samples were dehydrated in ethanol, cleared in toluene and embedded in paraffin, according to conventional procedures. Samples were sectioned at 5 µm (longitudinal sections) and sections were mounted on gelatin-coated slides.

Then, Cyp17a1 and Cyp11c1 labeling on zebrafish testes were performed by fluorescent immunohistochemistry as described below. Sections from four or five fish per condition were used in the present study. Briefly, sections were dewaxed and rehydrated, and antigens were unmasked for 3 h at 80 °C in ethylenediaminetetraacetic acid buffer (pH 8.5). Tissue sections were then incubated for 1 h in a saturation PBS solution containing 0.2% Triton X-100 and 1% milk powder. Incubations with the anti-zebrafish Cyp17a1 antibody or the anti-rainbow trout Cyp11c1 antibody were performed overnight (1:300 with 0.5% milk powder in PBS) at room temperature. After rinsing, sections were incubated for 90 min with a goat anti-rabbit antibody (for Cyp17a1) or a goat anti-rat antibody (for Cyp11c1) coupled to Alexafluor 594 (1:200 with 0.5% milk powder in PBS). The specificity of the staining was controlled by processing adjacent sections without primary antibody, with the pre immune serum or with the antibody pre-absorbed with the synthetic peptides.

## 2.6. 11-KT blood level determination

11-KT was quantified in blood samples by means of a competitive ELISA, following manufacturer's instructions (11-KT EIA Kit, Cayman Chemical Company, Ann Harbor, U.S.A.). The mean EC50 ± standard deviation was  $8.6 \pm 0.7$  pg/mL ( $n = 6$  independent experiments). The calculated coefficient of variation between assays was 8%, and the detection limit was 2.8 pg/mL ± 0.3 pg/mL. For the analysis, blood samples were assayed in triplicates with differential dilutions: 1:300; 1:900; 1:2700 in EIA buffer. To sum up the principle, acetylcholinesterase (AChE)-labeled 11-KT (secondary antibody) was added to the pre-coated wells with primary antibody anti-11-KT. A competition was established between 11-KT-AChE and natural 11-KT supplied by samples. The plate was then incubated overnight (18 h, 4 °C), washed 5 times with wash buffer and Ellman's reagent was added to the wells. Finally, the plates were developed on an orbital shaker for 75 min, before reading at 420 nm using a microtiter plate reader (EL340, Bio-Tek Instrument).

## 2.7. Data analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test for differences between treatments. Then, differences among treatments were determined using a *post hoc* test (Tukey Honestly Significant Difference). Normality of the data was previously assessed using a Shapiro test and homogeneity of variance was also verified using the Bartlett test. Non-normally distributed data were log-transformed prior to analysis and a non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by a multiple comparison test, was used when data did not meet parametric assumptions. Furthermore, non-parametric Spearman rank correlation tests were applied to test correlations among expression levels of different testicular genes for each condition.

Levels of gene expressions were expressed as fold changes relative to the average value of the control. Statistical analyses were conducted using R<sup>TM</sup> (R 2.13.1, software, R development Core Team). All data are presented as mean ± standard error to the mean (SEM) except for biometrical parameters that are presented as mean ± standard deviation (SD). Significance level ( $p$ ) was fixed at 0.05 ( $p < 0.05^*$ ;  $p < 0.01^{**}$ ;  $p < 0.001^{***}$ ).

**Table 1**

Clotrimazole concentrations measured in tank at  $t = 0$  h and  $t = 24$  h.

	SC	Low	Medium	High
Measured (µg/L) $t = 0$ h	<LOD	71	159	258
Measured (µg/L) $t = 24$ h	<LOD	55	149	229

SC: solvent control, LOD: limit of detection.

## 3. Results

### 3.1. Water chemistry

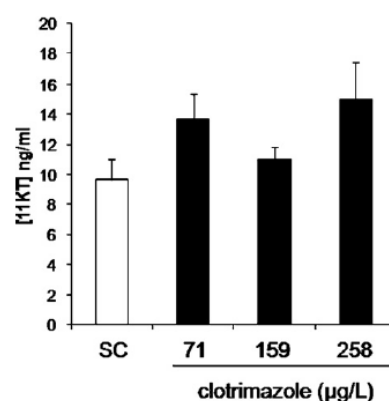
Water concentrations of clotrimazole measured at T0 (day 5) in the clotrimazole-treated tanks were 71, 159 and 258 µg/L for the low, medium, and high contaminations, respectively (Table 1). After 24 h, concentrations declined by 22%, 6% and 11% of the concentrations measured at T0 respectively. Control water samples were all below the limit of detection; i.e. 1.5 µg/L.

### 3.2. Biometrical parameters

There was no clotrimazole-induced mortality or any observation of abnormal behavior during the study. Furthermore, no significant differences were observed between clotrimazole-contaminated fishes and controls in body weight, length or GSI (Table 2).

### 3.3. 11-KT concentrations in blood

Circulating concentrations of 11-KT were quantified in control and exposed-fish. In control fish, the mean measured concentration was  $9.6 \pm 5.5$  ng/mL, which agrees with previously reported data in adult male zebrafish (Brown et al., 2011; Hinfray et al., 2011). In controls, 11-KT concentrations ranged between 6.4 and 21.8 ng/mL. Although there was no significant difference between control and clotrimazole-exposed fish (Fig. 1), we noted an increased inter-individual variation in the group exposed to the highest concentration of clotrimazole: 2 of 20 fish had concentrations of 0.36 and 1 ng/mL and 5 of 20 fish had elevated concentrations of 11-KT between 25.1 and 33.7 ng/mL.



**Fig. 1.** *In vivo* effect of clotrimazole on circulating 11-KT concentration following a 7 days exposure. Data are represented as mean ± SEM and expressed in pg/mL ( $N = 16$ –20 fish per condition). Each blood sample was analyzed in triplicate. 11-KT = 11-ketotestosterone.

**Table 2**

Fish biometrical parameters after the 7 days exposure.

Group	N	Body weight (mg)	Gonad weight (mg)	Body length (cm)	GSI (%)
Solvent control	20	475 ± 69	8.1 ± 2.6	3.8 ± 0.2	1.7 ± 0.4
Clotrimazole low	20	416 ± 87	6.3 ± 2.8	3.8 ± 0.2	1.6 ± 0.3
Clotrimazole medium	18	448 ± 81	7.0 ± 2.8	3.8 ± 0.2	1.5 ± 0.4
Clotrimazole high	20	492 ± 86	7.9 ± 2.7	3.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3

GSI = Gonado somatic index.

### 3.4. Expression of steroidogenesis-related genes

Transcriptional levels of genes involved in gonadal steroidogenesis were determined by Q-PCR and compared in control and clotrimazole-exposed groups.

4 of the 6 steroidogenic genes measured were up-regulated in a concentration-dependent manner (Fig. 2). A 1.7-fold induction was observed for *star* transcript levels at 159 µg/L ( $p < 0.01$ ) and 258 µg/L ( $p < 0.05$ ). The 3 other over-expressed genes belonged to the CYP family. Among them, *cyp17a1* was induced most clearly, with a significant up-regulation at the lowest concentration ( $p < 0.001$ ) and a 3-fold induction at 159 ( $p < 0.001$ ) and 258 µg/L ( $p < 0.001$ ). For *cyp11c1*, a significant 2-fold increase was measured at 159 µg/L and 258 µg/L ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  respectively). *Star*, *cyp17a1* and *cyp11c1* showed similar patterns of expression and their expression was significantly correlated in control and clotrimazole-exposed groups (Table S2). Interestingly, the correlation between steroidogenic genes was stronger in all clotrimazole-exposed groups than in the control group (Table S2). *Cyp19a1a* was also significantly (2-fold) up-regulated ( $p < 0.05$ ) but only at the highest concentration of clotrimazole.

### 3.5. Cyp17a1 and Cyp11c1 immunostaining in testes

The effect of clotrimazole on Cyp17a1 and Cyp11c1 protein expression was examined by fluorescent immunohistochemistry in testis sections using specific polyclonal antibodies (Fig. 3). We observed a strong increase of Cyp17a1 and Cyp11c1 protein expressions that both were localized in Leydig cells. Pictures presented in Fig. 3 are representative of all individuals for each condition. Cyp17a1 immunostaining was induced from 71 µg/L to 258 µg/L (Fig. 3A) and Cyp11c1 was clearly induced at the highest concentration of clotrimazole (Fig. 3B).

### 3.6. Expression of pituitary gonadotropins and their gonadal receptors

An 8- and 6-fold up-regulation of pituitary *fshb* was observed at 159 µg/L and 258 µg/L, respectively (Fig. 4A). Still, statistical significance was not reached, probably due to the high variability of transcript levels, in particular in the clotrimazole-exposed groups.

In testes, *fshr* was up-regulated 1.65-fold in the 159 µg/L clotrimazole-exposed group ( $p < 0.01$ ), whereas no effect was observed for *lhcg* transcripts levels (Fig. 4B). Interestingly, significant and strong correlations were found between *fshr* expression and either *star*, *cyp17a1* or *cyp11c1* in clotrimazole-exposed groups, whereas such correlations were not found in the control group (Fig. 5, Table S2).

### 3.7. Expression of insulin-like growth factor 3 (*igf3*) and anti-müllerian hormone (*amh*)

The data presented above showed that Leydig cell genes related to steroidogenesis were affected by clotrimazole. To determine whether genes expressed in Sertoli cells and known to be regulated by Fsh respond to clotrimazole exposure *in vivo*, we quantified

*amh* and *igf3* mRNA levels. While the exposure had no effect on *amh* expression, significantly increased *igf3* mRNA levels (3-fold induction) were found at the intermediate clotrimazole concentration of 159 µg/L ( $p < 0.05$ , Fig. 6).

## 4. Discussion

In this study, we investigated the effects of clotrimazole on the expression and function of genes operating at crucial sites within the pituitary-gonad axis in adult male zebrafish. Our data demonstrate that clotrimazole induced the expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells (mRNA and protein level) that are required for the production of the 11-oxygenated androgens typically found in fish (like 11-KT), while circulating androgen concentrations were not altered. Measurement of transcript levels of pituitary *fshb*, testicular *fshr* and the significant correlations between *fshr* and expression of steroidogenesis-related genes suggest that gonadotropins, in particular Fsh, are involved in the clotrimazole-induced changes in testicular physiology. Additional evidence for an increased signaling via Fsh/Fshr is provided by the induction of *igf3*, a gene expressed by Sertoli cells and up-regulated by Fsh (Nobrega, Morais, de Waal, Bogerd and Schulz; unpublished data). This data set highlights the importance of studying expression and functioning of key genes of the pituitary-gonad axis to start elucidating the mode of action of clotrimazole on the endocrine system of fish.

### 4.1. Clotrimazole-induced expression of testicular genes related to steroidogenesis

In the present study, short-term *in vivo* exposure of zebrafish to clotrimazole led to over-expression in zebrafish testis of *star* and steroidogenic enzymes crucial for fish androgen production, i.e. *cyp17a1* and *cyp11c1*. Interestingly, expression of these genes was strongly correlated in clotrimazole-treated groups, suggesting an orchestrated response to clotrimazole (Fig. 2, Table S2). By means of immunohistochemistry, we further showed an increased of Cyp17a1 and Cyp11c1 protein levels in Leydig cells, suggesting *de novo* synthesis of these enzymes. This is in agreement with previously published data on the effect of clotrimazole on *cyp17a1* expression in zebrafish (Hinfray et al., 2011) and extends the findings to another steroidogenic enzyme. Even though clotrimazole concentrations used to trigger *in vivo* changes in testicular steroidogenesis-related genes are higher than concentrations found in the aquatic environment (Garcia-Valcarcel and Tadeo, 2011; Lacey et al., 2012), it should be stressed that clotrimazole can potentially bioaccumulated in fish given its lipophilic nature (OSPAR, 2005; Schulz et al., 2012).

Induction of testicular steroidogenic gene expression following exposure to other azole fungicides (ketoconazole and prochloraz) has been reported in fathead minnow and medaka (Ankley et al., 2007; Zhang et al., 2008). Interestingly, in fathead minnow exposed to flutamide, an androgen receptor antagonist, *cyp17a1* and *hsd11b3a* were induced in testes (Filby et al., 2007). Induction of steroidogenic genes in testes of flutamide-exposed fathead minnow has been interpreted as an inhibitory action on endogenous

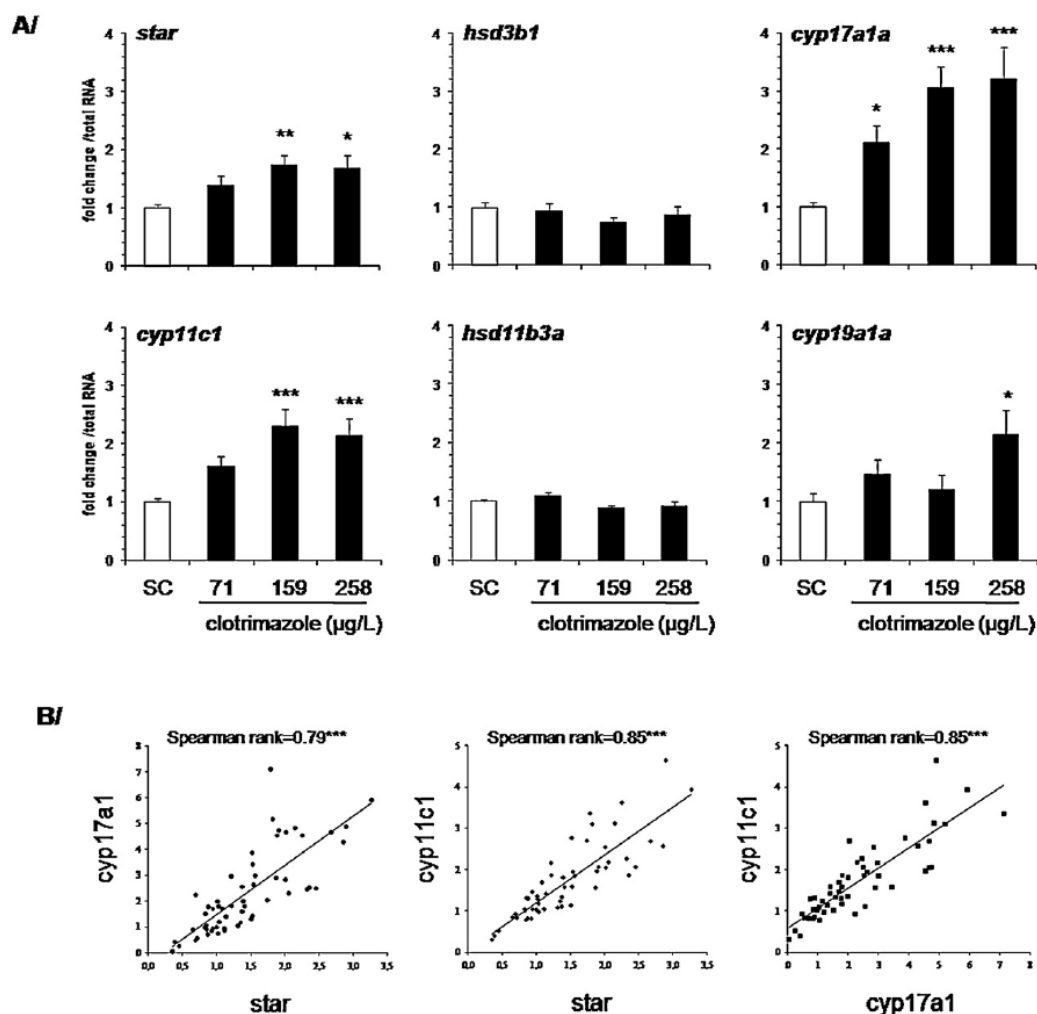


Fig. 2. (A) *In vivo* effect of clotrimazole on key testicular gene expressions following a 7 days exposure. Data are represented as mean  $\pm$  SEM and expressed as fold change in mRNA expression from the control. Relative mRNA expression was determined as the ratio of target gene mRNA/2  $\mu$ g total RNA ( $N=12-19$  fish per condition). Each sample was analyzed in duplicate. (B) Correlation between *star*, *cyp17a1* and *cyp11c1* expressions in control group and clotrimazole-exposed groups. Spearman rank number is indicated. Asterisks indicated a significant difference compared to control group (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

androgen negative feedback pathways (Filby et al., 2007). While prochloraz and ketoconazole behaved also as androgen receptor agonists (Eil, 1992; Vinggaard et al., 2002), clotrimazole did not bind to AR in mammals (Ayub and Levell, 1989; Eil, 1992); information as regards the possible binding to piscine ARs is not available. Therefore, it is unlikely that induction of steroidogenic genes in zebrafish exposed to clotrimazole involve an inhibitory action of endogenous androgens. On the contrary, the primary mode of action of clotrimazole on testicular steroidogenesis is through the inhibition of cytochrome P-450 dependent steroidogenic enzyme activities. Indeed, previous studies reported that clotrimazole inhibited ovarian P450 aromatase and testicular P450 Cyp17 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20 lyase enzyme activities in *in vitro* microsomal assays at concentrations ranging from 0.01  $\mu$ M to 1.7  $\mu$ M depending on the model used and the enzyme activity assessed (Ayub and Levell, 1987a,b; Hinfray et al., 2006; Monod et al., 1993; Schuster, 1985). We assume that this inhibitory action on cytochrome P-450 dependent steroidogenic enzymes explains,

at least partially, the inhibition of 11-KT production that we measured previously in the culture medium of zebrafish testicular explants after a 6-days *in vitro* exposure to 1  $\mu$ M (equivalent to 344.8  $\mu$ g/L) clotrimazole (Hinfray et al., 2011). These data, demonstrating the *in vitro* inhibitory action of clotrimazole on 11-KT production, seemingly contrast with *in vivo* results showing that 11-KT blood concentrations were not affected in males after a comparable time (7 days) and concentration (258  $\mu$ g/L) of exposure to clotrimazole, as reported herein and in our previous work (Hinfray et al., 2011). The *in vivo* over-expression of steroidogenic genes has been interpreted as a compensatory response to inhibiting enzyme activities (Ankley et al., 2007; Hinfray et al., 2011; Villeneuve et al., 2007b; Zhang et al., 2008) and would also explain that no significant effect of clotrimazole on 11-KT blood concentrations was measured (this study, (Hinfray et al., 2011)). In this setting we assume that clotrimazole initially induced a decrease of testicular androgen output and hence a depression of circulating androgen levels, which triggered the compensatory response, resulting in an



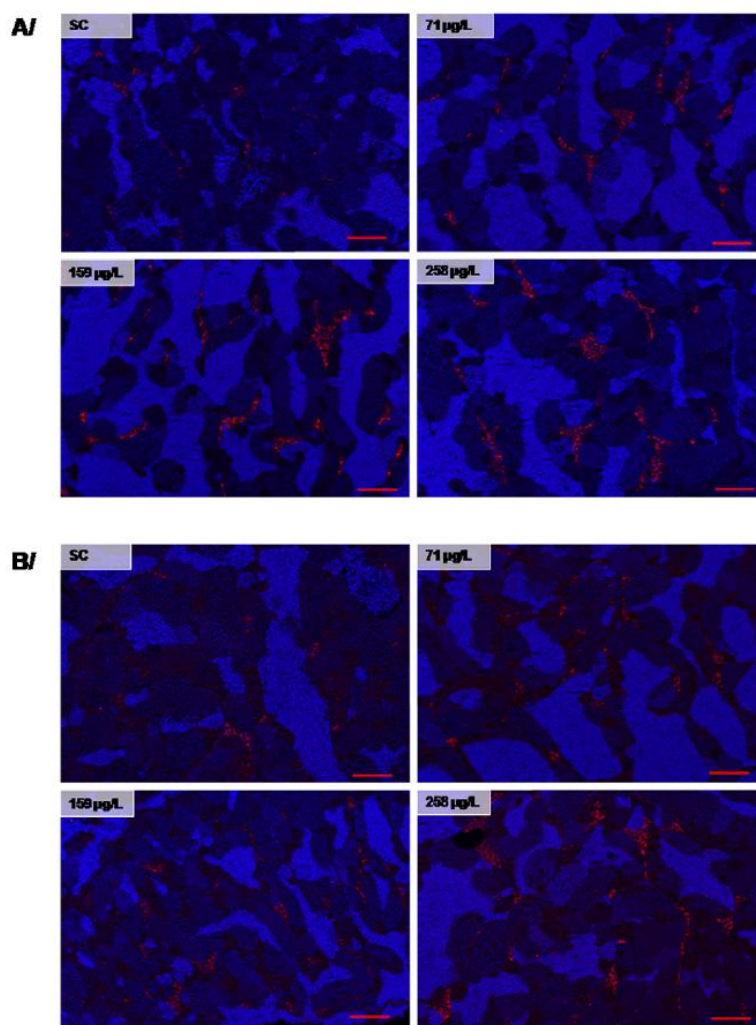


Fig. 3. (A) Cyp17-l and (B) Cyp11c1 labeling on zebrafish testes by fluorescent immunohistochemistry following a 7 days exposure to clotrimazole. Immunostaining was observed in all individuals and localized in Leydig cells ( $N = 4$ –5 fish per condition). The present pictures are representative of all individuals. Red: P450c17 and P450c11B immunostaining, blue: Hoechst. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$  (red). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

increased *de novo* synthesis of steroidogenic enzymes, allowing to attain normal circulating androgen levels. Such transient depression of circulating 11-KT was recently reported after 1 and 4 days of exposure of fish to 30 and 300  $\mu\text{g/L}$  of ketoconazole while 11-KT concentrations return to a normal level after 8 days (Ankley et al., 2012). Physiologically, a transient decrease in circulating androgen levels seems a signal similar to reduced signaling *via* the AR, which may explain the similarity of the response to the AR antagonist flutamide and to clotrimazole. However, it should be noted that high inter-individual variability was observed in the group of fish exposed to the highest concentration of clotrimazole, perhaps reflecting that the physiological limits of compensation have been reached. For instance, some fish had very high levels of 11-KT (overcompensated), while others had very low levels. In the latter, up-regulation of enzyme expression may be insufficient to balance the pharmaceutical's inhibitory effect on enzyme activity.

#### 4.2. The effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis is likely regulated by pituitary follicle-stimulating hormone

To support the hypothesis that the increased activity of the steroidogenic system may be due to a compensatory response of feedback loops within the HPG-axis to overcome the fungicide-mediated inhibition of enzyme activities, we studied the expression of genes encoding for gonadotropin  $\beta$ -subunits as well as the testicular expression of gonadotropin receptors. At the pituitary level, induction of genes encoding for the  $\beta$ -subunit of Fsh, but not of Lh, was observed in clotrimazole-exposed fish. However, probably due to the variability of expression between individuals within groups, these effects did not reach statistical significance. Concomitantly, a significant up-regulation of the *fshr*, but not the *lhcr*, gene expression was measured in testes of clotrimazole-exposed fish. Moreover, *fshr* expression was strongly correlated with the expression of testicular genes related to steroidogenesis in

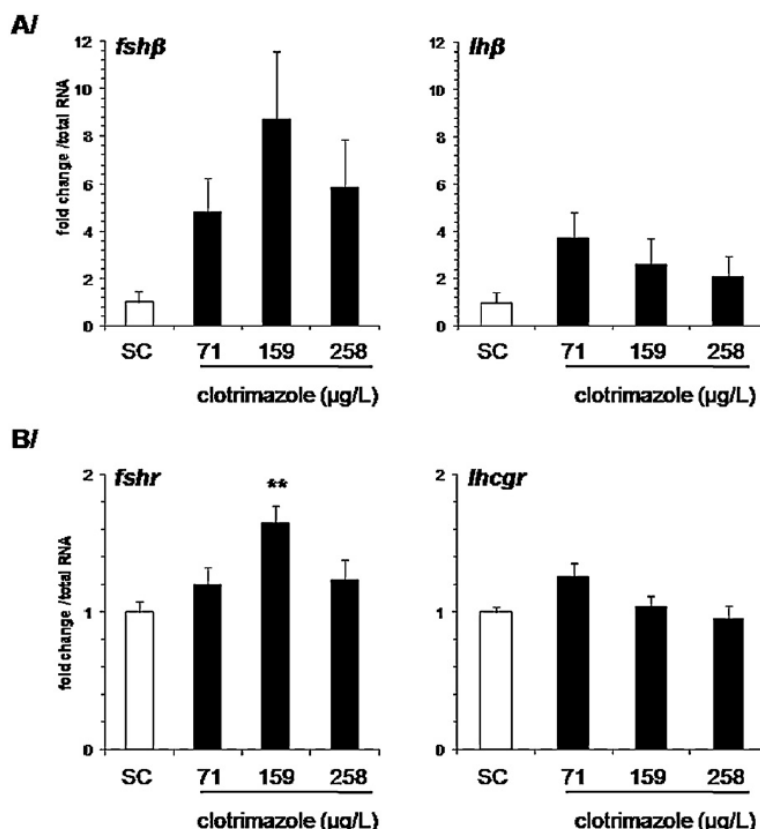


Fig. 4. *In vivo* effect of clotrimazole on (A) pituitary gonadotropins  $\beta$  subunit and (B) testicular gonadotropin receptors gene expressions following a 7 days exposure. Data are represented as mean  $\pm$  SEM and expressed as fold change in mRNA expression from the control ( $N = 11$ –19 fish per condition). Relative mRNA expression was determined as the ratio of target gene mRNA/2  $\mu$ g RNA. Each sample was analyzed in duplicate. Asterisks indicated a significant difference compared to control group (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ ).

clotrimazole-exposed groups (Figure 5, Table S2). As regards *lhcgrr* mRNA levels, no clear correlation with steroidogenic genes was found. In agreement with these findings, it has been shown that Fsh is a potent steroidogenic hormone in fish, acting through the Fshr, which in fish is also expressed by Leydig cells. In Japanese eel and zebrafish, recombinant Fsh, but not Lh, induced *star* and *cyp17a1* gene expressions in testicular explants system (García-López et al., 2010; Kazeto et al., 2008). Activation of Fsh-/Fshr signaling pathway in response to a decrease in androgen production is further illustrated by a recent work in which unilateral gonadectomy in male African catfish lead to induction of *fshr* gene expression and steroid production capacity of the remaining testis. In consequence, the final concentration of androgens was unchanged (Schulz et al., 2012).

Taken together, these data suggest that Fsh-/Fshr-signaling played an important role in mediating the clotrimazole-induced compensatory response of the steroidogenic Leydig cells. Interestingly in mammals, treatment of male with azole compounds such as anastrozole and letrozole led to increase concentrations of circulating gonadotropins and testosterone (de Boer et al., 2005; Goetz et al., 2009; Turner et al., 2000). This supports the view that disruption of the HPG axis by azoles is well-conserved among vertebrates with the notable difference that in fish Fsh seems to play a predominant role in stimulating steroidogenesis.

In addition to affecting steroidogenesis in Leydig cells, clotrimazole exposure up-regulated the levels of *igf3* mRNA. *Igf3* is a

recently discovered member of the Igf family that is only present in fish and is expressed specifically in gonadal tissue (Wang et al., 2008). In zebrafish, *igf3* expression was localized in Sertoli cells and testicular expression of *igf3* is up-regulated by zebrafish Fsh, but not by Lh (Nobrega, Morais, de Waal, Bogerd and Schulz; unpublished data). Our results, showing an up-regulation of *igf3* expression in testes of clotrimazole-exposed fish, are thus also consistent with activating Fsh-/Fshr-signaling.

In addition to these molecular and cellular changes, we previously reported an increased proportion of spermatogonia type A in clotrimazole-exposed fish under similar conditions of exposure (Hinfray et al., 2011). However, in this study no significant difference as regards *piwil1* gene expression, a spermatogonial marker (Leal et al., 2009), was seen between treatment groups (Fig. S1). Nonetheless, considering the role of Fsh-stimulated androgen production and the role of androgens in stimulating the first steps of spermatogenesis (Campbell et al., 2003), as well as the stimulation of germ cell mitosis by other Igf peptides (Loir, 1994), we hypothesize that the effects seen at the histological level on spermatogonial proliferation in our previous study (Hinfray et al., 2011) may have been a direct consequence of the Fsh-mediated effect on the testes of zebrafish exposed to clotrimazole.

In conclusion, this study provides further evidence of the endocrine disrupting potency of clotrimazole in fish as demonstrated by the elevated expression of steroidogenesis-related genes in testicular tissue. By studying a functional network of genes

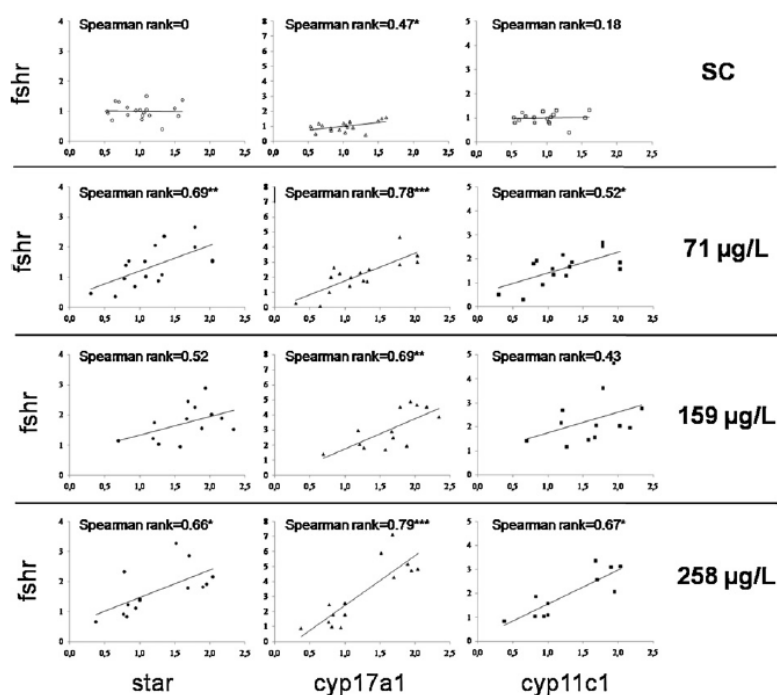


Fig. 5. Correlation between *fshr* expression and *star*, *cyp17a1* and *cyp11c1* expressions in control group and clotrimazole-exposed-groups. Spearman rank number is indicated. Asterisks indicated a significant correlation (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ ).

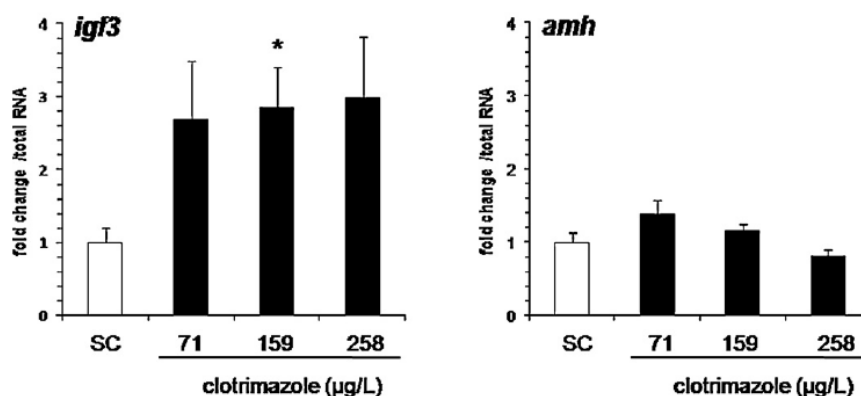


Fig. 6. *In vivo* effect of clotrimazole on Sertoli cell marker expressions following a 7 days exposure. Data are represented as mean  $\pm$  SEM and expressed as fold change in mRNA expression from the control. Relative mRNA expression was determined as the ratio of target gene mRNA/2 µg total RNA ( $N = 12$ –19 fish per condition). Asterisks indicated a significant difference compared to control group (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

operating in the pituitary-gonad axis, we show that clotrimazole induced a cascade of molecular and cellular events at the pituitary and testicular level that is compatible with assuming an important role for Fsh (1) in stimulating Leydig cell steroidogenesis to compensate the inhibitory action of clotrimazole on 11-KT synthesis and (2) in inducing the expression of the Fsh-regulated *igf3* gene in Sertoli cells. Studying this gene network along the pituitary-gonad axis appears useful and relevant to elucidate further the mode of action of clotrimazole and it demonstrated that this chemical

triggered in a model vertebrate compensatory responses of the HPG axis. This approach could be extended to other azole compounds acting as inhibitor of P450-steroidogenic enzymes in *in vitro* assays (Hecker et al., 2006; Heneweir et al., 2004; Laville et al., 2006; Vinggaard et al., 2000).

#### Conflict of interest statement

None.



## Acknowledgments

This work was funded by a grant of the French ministry of Ecology P189-NEMO to FB, the French National Research Agency (Project NEED, CES 2008-011) to FB and by the European Union LIFECYCLE projects no FP7-222719 to RWS. DB was supported by a doctoral fellowship from ANRT and INERIS. The authors would like to thank Dr. Alexis Fostier (INRA, Rennes, France) for its comments of this manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.04.012>.

## References

- Ankley, G.T., Cavallin, J.E., Durhan, E.J., Jensen, K.M., Kalh, M.D., Makynen, E.A., Thomas, L.M., Wehmas, L.C., Villeneuve, D.L., 2012. A time-course analysis of effects of the steroidogenesis inhibitor ketoconazole on components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 114–115, 88–95.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Blake, L.S., Greene, K.J., Johnson, R.D., Villeneuve, D.L., 2007. Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): reproductive toxicity and biological compensation. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1214–1223.
- Arukwe, A., 2006. Toxicological housekeeping genes: do they really keep the house? *Environ. Sci. Technol.* 40, 7944–7949.
- Ayub, M., Levell, M.J., 1989. The effect of ketoconazole related imidazole drugs and antiandrogens on [H-3] R1881 binding to the prostatic androgen receptor and [H-3]5- $\alpha$ -dihydrotestosterone and [H-3] cortisol binding to plasma-proteins. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 33, 251–255.
- Ayub, M., Levell, M.J., 1987a. Inhibition of testicular 17- $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase by imidazole drugs. *J. Endocrinol.* 112, 42–42.
- Ayub, M., Levell, M.J., 1987b. Inhibition of testicular 17- $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase but not 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase or 17- $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase by ketoconazole and other imidazole drugs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 28, 521–531.
- Brown, A.R., Bickley, L.K., Le Page, G., Hosken, D.J., Paull, G.C., Hamilton, P.B., Owen, S.F., Robinson, J., Sharpe, A.D., Tyler, C.R., 2011. Are toxicological responses in laboratory (inbred) zebrafish representative of those in outbred (wild) populations?—a case study with an endocrine disrupting chemical. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4166–4172.
- Burns, K.H., Matzuk, M.M., 2002. Minireview: genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology* 143, 2823–2835.
- Campbell, B., Dickey, J.T., Swanson, P., 2003. Endocrine changes during onset of puberty in male spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol. Reprod.* 69, 2109–2117.
- de Boer, H., Verschoor, L., Ruinmians-Koerts, J., Jansen, M., 2005. Letrozole normalizes serum testosterone in severely obese men with hypogonadotropic hypogonadism. *Diabetes Obes. Metab.* 7, 211–215.
- Eil, C., 1992. Ketoconazole binds to the human androgen receptor. *Horm. Metab. Res.* 24, 367–370.
- Filby, A.L., Thorpe, K.L., Maack, G., Tyler, C.R., 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquat. Toxicol.* 81, 219–231.
- García-Lopez, A., Bogerd, J., Granneman, J.C.M., van Dijk, W., Trant, J.M., Taranger, G.L., Schulz, R.W., 2009. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology* 150, 357–365.
- García-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R.H., de Waal, P.P., van Dijk, W., Hemrika, W., Taranger, G.L., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2010. Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology* 151, 2349–2360.
- García-Valcarcel, A.L., Tadeo, J.L., 2011. Determination of azoles in sewage sludge from Spanish wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 34, 1228–1235.
- Goetz, A.K., Rockett, J.C., Ren, H.Z., Thillainadarajah, I., Dix, D.J., 2009. Inhibition of rat and human steroidogenesis by triazole antifungals. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 55, 214–226.
- Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R., Giesy, J.P., 2006. Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 114–124.
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2004. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Lett.* 146, 183–194.
- Henry, M.J., Sisler, H.D., 1984. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (Sbi) fungicides on cytochrome-P-450 oxygenations in fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 262–275.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86, 6–19.
- Hinfray, N., Baudiffier, D., Leal, M.C., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., Le Gac, F., Schulz, R.W., Brion, F., 2011. Characterization of testicular expression of P450 17  $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 309–317.
- Hinfray, N., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 144, 252–262.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. *Genes Immun.* 6, 279–284.
- Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J.M., Adachi, S., Yamauchi, K., 2008. Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol. Reprod.* 79, 938–946.
- Lacey, C., Basha, S., Morrissey, A., Tobin, J.M., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin. *Ireland. Environ. Monit. Assess.* 184, 1049–1062.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfray, N., Casellas, C., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228, 98–108.
- Leal, M.C., de Waal, P.P., García-Lopez, A., Chen, S.X., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2009. Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 134–138.
- Lemaire, G., de Sousa, G., Rahmani, R., 2004. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2347–2358.
- Liu, C.S., Zhang, X.W., Deng, J., Hecker, M., Al-Khedhairi, A., Giesy, J.P., Zhou, B.S., 2011. Effects of prochloraz or propylthiouracil on the cross-talk between the HPG, HPA, and HPT axes in zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 45, 769–775.
- Loir, M., 1994. In vitro approach to the control of spermatogonia proliferation in the trout. *Mol. Cell. Endocrinol.* 102, 141–150.
- Miller, W.L., 1988. Molecular-biology of steroid-hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9, 295–318.
- Monod, G., Demones, A., Fostier, A., 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol secretion by imidazole fungicides in rainbow-trout. *Mar. Environ. Res.* 35, 153–157.
- Moore, J.T., Klierer, S.A., 2000. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology* 153, 1–10.
- Navas, J.M., Chana, A., Herradon, B., Segner, H., 2004. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. *Life Sci.* 76, 699–714.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T., 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.* 77, 970–977.
- OSPAR, 2005. OSPAR Background document on clotrimazole. ISBN: 1-94426-38-7.
- Parker, K.L., Schimmer, B.P., 1995. Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitam. Horm.* 51, 339–370.
- Peschka, M., Roberts, P.H., Knepper, T.P., 2007. Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 959–968.
- Schulz, R.W., de Franca, L.R., Lareyre, J.J., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411.
- Schulz, R.W., Van Dijk, W., Chavez-Pozo, E., García-Lopez, A., de Franca, L.R., Bogerd, J., 2012. Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.03.001>.
- Schuster, I., 1985. The interaction of representative members from 2 classes of antimycotics – the Azoles and the allylamines – with cytochromes-P-450 in steroidogenic tissues and liver. *Xenobiotica* 15, 529–546.
- Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B., 2011. Zebrafish—as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res. Part C: Embryo Today Rev.* 93, 256–267.
- Skolness, S.Y., Durhan, E.J., García-Reyero, N., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Martinovic-Weigelt, D., Perkins, E., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., 2011. Effects of a short-term exposure to the fungicide prochloraz on endocrine function and gene expression in female fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 103, 170–178.
- Turner, K.J., Morley, M., Atanassova, N., Swanson, I.D., Sharpe, R.M., 2000. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J. Endocrinol.* 164, 225–238.
- Villeneuve, D.L., Blake, L.S., Brodin, J.D., Greene, K.J., Knoebel, I., Miracle, A.L., Martinovic, D., Ankley, G.T., 2007a. Transcription of key genes regulating gonadal steroidogenesis in control and ketoconazole- or vinclozolin-exposed fathead minnows. *Toxicol. Sci.* 98, 395–407.
- Villeneuve, D.L., Miracle, A.L., Jensen, K.M., Degitz, S.J., Kahl, M.D., Korte, J.J., Greene, K.J., Blake, L.S., Linnam, A.L., Ankley, G.T., 2007b. Development of quantitative real-time PCR assays for fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadotropin beta subunit mRNAs to support endocrine disruptor research. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 145, 171–183.

- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. Vitro* 14, 227–234.
- Vinggaard, A.M., Nellemann, C., Dalgaard, M., Jorgensen, E.B., Andersen, H.R., 2002. Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicol. Sci.* 69, 344–353.
- Wang, D.S., Jiao, B.W., Hu, C.J., Huang, X.G., Liu, Z.H., Cheng, C.H.K., 2008. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 336–341.
- Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., Newsted, J., Au, D., Kong, R., Wu, R.S.S., Giesy, J.P., 2008. Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6762–6769.
- Zmora, N., Kazeto, Y., Kumar, R.S., Schulz, R.W., Trant, J.M., 2007. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 Drosophila cell line and an indication of their different actions. *J. Endocrinol.* 194, 407–416.
- Zohar, Y., Munoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 438–455.

Données supplémentaires (article 1)**table S1:** primer sequences of target genes

Organ	Name	forward primer sequence (5' --> 3')	reverse primer sequence (5' --> 3')	GenBank ID
testis	<i>star</i>	ACCTGTTTTCTGGCTGGGATG	GGGTCCATTCTCAGCCCTTAC	NM_131663
	<i>hsd3b1</i>	GCAACTCTGGTTTTCCACACTG	CAGCAGGAGCCGTGTAGCTT	NM_212797.1
	<i>cyp17a1</i>	GGGAGGCCACGGACTGTTA	CCATGTGGAAGTGTAGTCAGCAA	NM_212806.3
	<i>cyp11c1</i>	GCTCATGCACATTCTGAGGA	TGTGCTGAAGGTGATTCTCG	DQ650710.1
	<i>hsd11b3a</i>	TGGTGAAGTATGCCATCGAA	AGTAGCCATCGTGTGTGCTG	AY578180
	<i>cyp19a1a</i>	CTGAAAGGGCTCAGGACAA	TGGTCGATGGTGTCTGATG	AF_226620
	<i>lhcg</i>	ATCACTCACGCTCTCCGACT	GCTGCTGACGCCTATTAAGG	NM_205625.1
	<i>fshr</i>	GAGGATTCCCAGTAATGCTTTCCT	TCTATCTCACGAATCCCGTTCTTC	NM_001001812.1
	<i>amh</i>	CTCTGACCTTGATGAGCCTCATTT	GGATGTCCCTTAAGAACTTTTGCA	NM_001007779.1
	<i>igf3</i>	GTGCTGCGTTCTCATCCT	TGTTGAGGAGGTTTGGGT	NM_001115050
	<i>piwil1</i>	CAAAATGGGAGGAGAGCTGTG	CAAAGAATCGGGAGCTGATGC	NM_183338.1
pituitary	<i>lhβ</i>	GCAGAGACACTTACAACAGCC	AAAACCAAGCTCTGAGCAGCC	NM_205622.2
	<i>fshβ</i>	CAGATGAGGATGCGTGTGC	ACCCCTGCAGGACAGCC	NM_205624.1

Table S2: Spearman rank correlation coefficient r (number) and probabilities (\*) between gene expressions in control or clotrimazole- exposed male zebrafish (n=9-19)

<b>DMSO</b>								
A)	organ	genes	star	hsd3b1	cyp17a1	cyp11c1	hsd11b3a	
	<b>testis</b>	star						
		hsd3b1	0.03					
		cyp17a1	<b>0.62 **</b>	-0.22				
		cyp11c1	<b>0.69 **</b>	0.12	0.48			
		hsd11b3a	-0.19	-0.11	-0.1	0.21		
		cyp19a1a	-0.25	0.14	-0.18	0.03	0.26	
B)	organ	gene	lhβ					
	<b>pituitary</b>	fshβ	<b>0.85 ***</b>					
C)	organ	genes	star	hsd3b1	cyp17a1	cyp11c1	hsd11b3a	cyp19a1a lhcg
	<b>testis</b>	lhcg	-0.12	-0.04	-0.19	-0.01	0.47	<b>0.54 *</b>
		fshr	0	-0.1	<b>0.48 *</b>	0.17	0.3	-0.11 -0.26

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 indicate significant correlation between parameters

Table S2 (suite)

**Clotrimazole 71**

A)	organs	genes	star	hsd3b	cyp17a	cyp11c	hsd11b3		
	testis	star							
		hsd3b1	0.23						
		cyp17a1	<b>0.78</b>	0.23					
		cyp11c1	<b>0.94</b>	0.13	<b>0.72 **</b>				
		hsd11b3a	-0.15	0.26	-0.2	-0.1			
		cyp19a1a	-0.28	-0.37	<b>-0.57 *</b>	-0.26	0.45		
<hr/>									
<hr/>									
B)		gene	lhβ						
	pituitary	fshβ	<b>0.79 **</b>						
<hr/>									
C)	organs	genes	star	hsd3b	cyp17a	cyp11c	hsd11b3	cyp19a1	lhcg
	testis	lhcg	0.31	-0.29	-0.01	0.4	0.34	0.46	
		fshr	<b>0.68 **</b>	0.44	<b>0.78 ***</b>	<b>0.52 *</b>	-0.24	<b>-0.55 *</b>	0.13

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 indicate significant correlation between parameters

Table S2 (suite)

**Clotrimazole 159 µg/L**

A)	organs	genes	<i>star</i>	<i>hsd3b1</i>	<i>cyp17a1</i>	<i>cyp11c1</i>	<i>hsd11b3a</i>
	<b>testis</b>	<i>star</i>					
		<i>hsd3b1</i>	-0.32				
		<i>cyp17a1</i>	<b>0.75 **</b>	<b>-0.6 *</b>			
		<i>cyp11c1</i>	<b>0.65 *</b>	<b>-0.61 *</b>	<b>0.68 *</b>		
		<i>hsd11b3a</i>	0.32	-0.11	0.51	0.43	
		<i>cyp19a1a</i>	-0.07	-0.26	-0.05	0.47	0.12

B)	gene	<i>lhβ</i>
<b>pituitary</b>	<i>fshβ</i>	<b>0.98</b>

C)	organs	genes	<i>star</i>	<i>hsd3b1</i>	<i>cyp17a1</i>	<i>cyp11c1</i>	<i>hsd11b3a</i>	<i>cyp19a1a</i>	<i>lhgr</i>
	<b>testis</b>	<i>lhgr</i>	<b>0.57 *</b>	<b>-0.65 *</b>	<b>0.77 **</b>	<b>0.67 *</b>	0.36	0.32	
		<i>fshr</i>	0.52	-0.29	<b>0.69 **</b>	0.43	0.3	0.13	0.75

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 indicate significant correlation between parameters

Table S2 (suite)

**Clotrimazole 258**

A)	organs	genes	<i>star</i>	<i>hsd3b</i>	<i>cyp17a</i>	<i>cyp11c</i>	<i>hsd11b3</i>
	<b>testis</b>	<i>star</i>					
		<i>hsd3b1</i>	0.19				
		<i>cyp17a1</i>	<b>0.78 **</b>	0.46			
		<i>cyp11c1</i>	<b>0.84</b>	0.37	<b>0.93 ***</b>		
		<i>hsd11b3a</i>	0.51	0.39	<b>0.73 **</b>	<b>0.67 *</b>	
		<i>cyp19a1a</i>	<b>-0.6 *</b>	-0.24	<b>-0.67 **</b>	<b>-0.66 *</b>	-0.16

B)	genes	<i>lhβ</i>
<b>pituitary</b>	<i>fshβ</i>	<b>0.76 *</b>

C	organs	genes	<i>star</i>	<i>hsd3b</i>	<i>cyp17a</i>	<i>cyp11c</i>	<i>hsd11b3</i>	<i>cyp19a1</i>	<i>lhcg</i>
	<b>testis</b>	<i>lhcg</i>	0.49	-0.11	<b>0.61 *</b>	0.54	0.84	-0.09	
		<i>fshr</i>	<b>0.66 **</b>	<b>0.68 **</b>	<b>0.78 ***</b>	<b>0.67 *</b>	<b>0.6 *</b>	<b>-0.72 **</b>	0.34

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 indicate significant correlation between parameters

Figure S1 :

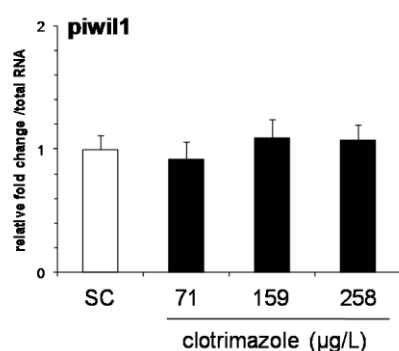


Figure S1: *In vivo* effect of clotrimazole on spermatogonial cell marker *piwil1* expression following a 7 days exposure. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as fold change in mRNA expression from the control. Relative mRNA expression was determined as the ratio of target gene mRNA / 2µg total RNA (N = 12-19 fish /condition). Asterisks indicated a significant difference compared to control group (\* p  $\leq$  0.05).

## **Chapitre III : Effet d'une exposition de 21 jours au clotrimazole sur l'axe hypophyse-gonade et impact sur la spermatogenèse**

### Contexte

Dans les 2 articles précédents, nous avons mis en évidence que le clotrimazole perturbait la physiologie testiculaire du poisson zèbre en induisant l'expression de plusieurs gènes et protéines clefs de la stéroïdogenèse. L'étude d'un réseau de gènes fonctionnels le long de l'axe hypophyse-gonade a permis de mieux caractériser le mécanisme d'action du clotrimazole, mettant notamment en avant le rôle de la Fsh hypophysaire et de son récepteur testiculaire. Ces effets observés au niveau moléculaire et cellulaire soulèvent la question de l'impact sur la spermatogenèse. Ce processus permet de produire des cellules germinales différenciées à partir de cellules souches spermatogoniales. Les cellules de Sertoli jouent également un rôle essentiel dans la spermatogenèse puisqu'elles sont à l'interface entre le milieu extérieur (espace interstitiel, circulation sanguine) et les cellules germinales. Chez les poissons, la Fsh est une gonadotropine puissante qui interagit avec son récepteur gonadique exprimé au niveau des cellules de Sertoli et de Leydig (Planas et al., 1993; Ohta et al., 2007). Les stéroïdes sexuels produits par les cellules de Leydig peuvent également interagir avec leurs récepteurs, notamment au niveau des cellules de Sertoli pour supporter le processus de spermatogenèse (Le Gac et al., 2008).

### Objectif expérimental

Au vue de l'ensemble des résultats qui ont permis mieux caractériser le mécanisme d'action du clotrimazole, il semble nécessaire d'aller plus loin en déterminant les effets d'une exposition de 21 jours sur :

- (1) *la stéroïdogenèse* : Est-elle encore induite avec une exposition à plus long terme ?
- (2) *la spermatogenèse* : Quels sont les effets au niveau de la spermatogenèse ? Y a-t-il des effets moléculaires et/ou cellulaires, à savoir quels sont les types de cellules germinales éventuellement affectés ? Peut-on finalement faire un lien entre des effets observés au niveau



de l'expression des gènes (moléculaire) et des effets observés au niveau tissulaire, laissant présager d'une perturbation de la fonction de reproduction ?

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit « **Effet d'une exposition *in vivo* chronique au clotrimazole sur la fonction testiculaire chez le zebrafish** », rédigé en anglais et soumis au journal *Environmental Science and Pollution Research* (Article 3) :

Damien Baudiffier, Nathalie Hinfray, Catherine Ravaud, Nicolas Creusot, Edith Chadili, Jean-Marc Porcher, Rüdiger Schulz, François Brion

### Résultats principaux (article 3)

Les résultats de l'étude montrent que la stéroïdogénèse est stimulée après 21 jours d'exposition au clotrimazole à des concentrations similaires à celles utilisées lors de l'exposition de 7 jours. Ces résultats confirment également le rôle critique de la voie de signalisation Fsh/FshR dans la médiation des effets du clotrimazole. Cependant, contrairement à ce qui a été observé à 7 jours, la concentration en 11-KT plasmatique est augmentée quand les poissons sont exposés à la plus forte concentration. Nous avons donc dans ce cas une sur-compensation, avec un déséquilibre entre l'inhibition potentielle des activités enzymatiques d'une part et l'induction de la stéroïdogénèse d'autre part, en faveur de l'induction de la stéroïdogénèse. De plus, l'analyse histologique des testicules montre que le nombre de cellules de Leydig dans l'espace interstitiel augmente à cette concentration d'exposition, ce qui pourrait partiellement rendre compte de l'augmentation du GSI. Ces résultats sont en accord avec d'autres études rapportant que l'exposition de poissons à des azoles se manifeste par une augmentation du GSI et de la proportion de cellules de Leydig chez les mâles (Ankley et al., 2007; Brown *et al.*, 2011). Notre étude indique donc que l'exposition au clotrimazole pendant 21 jours conduit à une induction de l'expression de gènes clefs de la stéroïdogénèse et à une augmentation des niveaux circulants de 11-KT. Cette stimulation globale de la stéroïdogénèse est accompagnée d'une prolifération des cellules de Leydig.

Au vu de ces événements, nous nous sommes interrogés sur les conséquences d'une telle exposition sur la spermatogénèse, d'un point de vue histologique mais aussi d'un point de vue moléculaire. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse morphométrique des gonades pour étudier les différents stades des cellules germinales. Cette analyse permet d'estimer la masse

(en mg) des différents types cellulaires à partir de coupes histologiques de testicules et de la masse du testicule. Les résultats ne montrent pas d'effets du clotrimazole sur les stades méiotiques ou post-méiotiques. En revanche, on note une augmentation significative du nombre de spermatogonies A, en accord avec l'induction de l'expression du gène *piwill*, un marqueur moléculaire spécifique des spermatogonies A. Au niveau moléculaire, nous avons également choisi de mesurer l'expression des gènes *ar* et *igf3* et nous montrons qu'ils sont induits suite l'exposition au clotrimazole. Ces gènes sont exprimés au niveau des cellules de Sertoli. Le gène *ar* est notamment très exprimé dans les cellules de Sertoli à proximité des stades précoces des cellules germinales, comme les spermatogonies A et *igf3* est un marqueur des cellules de Sertoli. *Ar* et *igf3* sont également connus pour être régulés par la Fsh (Nobrega, Morais, de Waal, Bogerd and Schulz; données non publiées) et nos résultats (induction de l'expression des gènes *ar* et *igf3*) sont en accord avec l'activation de la voie Fsh/FshR.

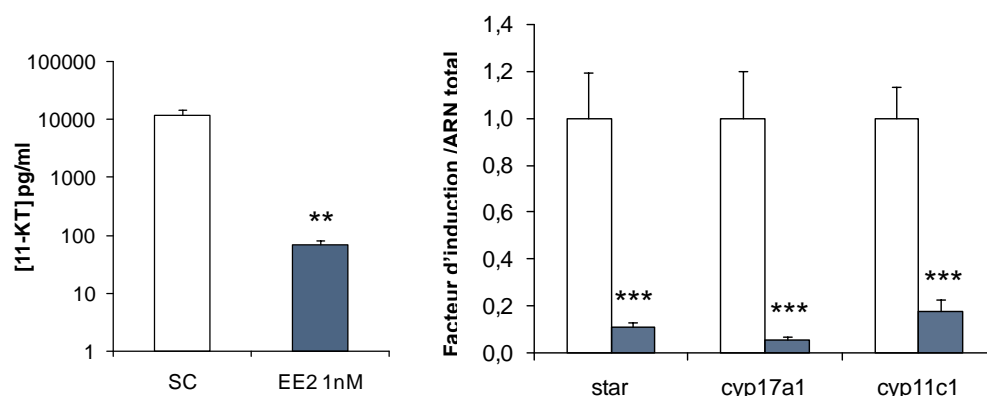
### Résultats complémentaires

Parallèlement à l'exposition au clotrimazole, des expositions à l'EE<sub>2</sub> et à l'E<sub>2</sub> ont été réalisées. En effet, ces composés œstrogéniques sont des inhibiteurs connus de l'expression des gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse chez le poisson zèbre adulte mâle (Govoroun *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2005; Filby *et al.*, 2006; Brion *et al.*, 2008; de Waal *et al.*, 2009). De plus, une étude récente a montré qu'une exposition de poissons zèbres adultes mâles à l'œstradiol (E<sub>2</sub>) *in vivo* mène à l'interruption de la spermatogénèse après une régulation négative de la synthèse d'androgènes testiculaires, probablement causée par l'inhibition du relargage des gonadotropines par le feedback négatif (de Waal *et al.*, 2009).

Le clotrimazole ayant pour effet d'induire la stéroïdogénèse, sans pour autant provoquer de changements majeurs au niveau de la spermatogénèse, il nous a semblé intéressant d'étudier les effets de composés œstrogéniques sur l'expression de gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse, sur la concentration sanguine en 11-KT et sur la spermatogénèse.

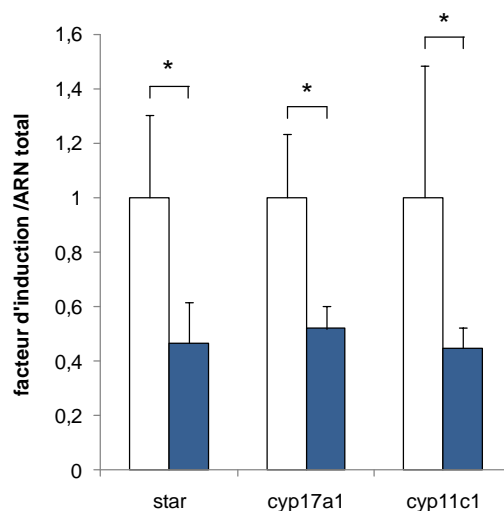
Dans un premier temps, des poissons ont été exposés *in vivo* à l'EE<sub>2</sub> 1nM pendant 7 jours. Les résultats indiquent que l'exposition à l'EE<sub>2</sub> se manifeste par une diminution très forte de l'expression des gènes *star*, *cyp17a1* et *cyp11c1* au niveau testiculaire. Au niveau

circulant, on constate une diminution spectaculaire des concentrations en 11-KT qui sont 100 fois moins importantes chez les poissons exposés comparativement au groupe contrôle (**figure 15**).



**Figure 15** : Effets de l'ethinyl oestradiol (EE<sub>2</sub>, 1nM) sur (A) la concentration plasmatique en 11-KT et (B) l'expression de gènes clés impliqués dans la stéroïdogénèse après une exposition de poissons zèbres adultes mâles pendant 7 jours *in vivo*. Les données sont représentées sous forme de Moyenne  $\pm$  S.E.M (A : n = 4-6, B : n = 8-10 poissons par condition). Barres blanches = témoins *solvent control* (SC), barres bleues = EE<sub>2</sub>. \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

Dans le modèle d'explant de testicules, nous constatons que l'EE<sub>2</sub> induit une diminution de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse. Comparativement aux expérimentations *in vivo*, les inhibitions sont cependant très peu marquées *in vitro* (**figure 16**) :



**Figure 16** : Effets *in vitro* de l'ethinyl oestradiol (EE<sub>2</sub>, [1 nM]) sur l'expression de gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse après une exposition d'explants testiculaires pendant 6 jours.

Les données sont représentées en moyennes d'expressions relatives par rapport aux témoins,  $\pm$  S.E.M (n = 4 – 7 poissons par condition). Barres blanches = témoins *solvent control* (SC), barres bleues = EE<sub>2</sub>. \* p<0,05, \*\* p<0,01.

En lien avec ces travaux, des poissons ont été exposés à l'œstradiol ( $E_2$ ) 10nM pendant 7 et 14 jours en vue de caractériser les effets de cette molécule sur la spermatogenèse. Ce travail a fait l'objet d'un article (**annexe 2**). Les résultats montrent que l' $E_2$  altère de façon marquée la spermatogenèse, puisque les masses respectives des différents types cellulaires différenciés, des spermatocytes aux spermatozoïdes, sont diminuées. Comme l' $EE_2$ , l' $E_2$  inhibe l'expression de gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse testiculaire. Dans l'article de l'annexe 2, nous montrons également que la suppression de la synthèse de Cyp17a1 par l' $E_2$  a lieu dans les cellules de Leydig mais pas dans les cellules germinales. Cela suggère que l'insuffisance en androgène induite par les œstrogènes dans les cellules de Leydig est un événement majeur dans l'altération de la spermatogenèse. Ces résultats sont cohérents avec une autre étude montrant que l'interruption de la spermatogenèse est causée par l'inhibition de la synthèse d'androgènes dans les testicules (de Waal et al., 2009). En revanche, dans cette étude, quelques différences apparaissent comparativement à la nôtre. Il y a une augmentation de la masse de spermatogonies A, cohérente avec l'effet de l'œstradiol sur le renouvellement de ce type cellulaire, et l'effet sur les spermatozoïdes est beaucoup moins marqué.

L'ensemble de ces données montre que les œstrogènes perturbent la stéroïdogénèse, la synthèse de 11-KT et la spermatogenèse, la diminution de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig apparaissant comme un événement majeur dans la cascade d'évènement conduisant à l'altération de la spermatogenèse. Cependant, dans le cas du clotrimazole, cette relation entre stéroïdogénèse et spermatogenèse est moins évidente, même si l'exposition des individus se manifeste par des inductions d'expression de gènes marqueurs, comme le gène *piwill*, spécifique des spermatogonies A.

## Conclusion

Après 21 jours d'exposition, le clotrimazole induit toujours la stéroïdogénèse. De plus, nous montrons qu'il induit la synthèse de 11-KT et entraîne une augmentation de l'indice gonado-somatique de manière marquée. Il y a une sur-compensation conduisant à une hyper-masculinisation des mâles. Ce résultat est marquant quand on sait qu'*in vitro*, le clotrimazole se comporte comme un « anti-androgène », en se basant sur sa capacité à inhiber la synthèse testiculaire de 11-KT. S'agissant des effets sur la spermatogenèse, les effets sont peu marqués sur les stades différenciés mais nous constatons une augmentation marquée du nombre des

spermatogonies A et une induction de l'expression de *piwill*. Ces résultats montrent l'intérêt de coupler des mesures histologiques et moléculaires dans le cas de l'étude du clotrimazole en tant que PE. Dans le cas des œstrogènes, nous montrons que la diminution de l'expression de gènes clefs de la stéroïdogénèse, comme *cyp17a1*, constitue un évènement important dans les effets induits sur la spermatogénèse, ce qui renforce également l'intérêt de la mesure de marqueurs moléculaires pour l'étude des effets des PE.

# Effect of *in vivo* chronic exposure to clotrimazole on zebrafish testis function

Baudiffier Damien<sup>1</sup>, Hinfray Nathalie<sup>1</sup>, Ravaud Catherine<sup>1</sup>, Creusot Nicolas<sup>1</sup>, Chadili Edith<sup>1</sup>, Porcher Jean-Marc<sup>1</sup>, Schulz Rüdiger<sup>2</sup>, Brion François<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>2</sup>University of Utrecht, Science Faculty, Department Biology, Division Developmental Biology, Reproductive Biology Group, Kruyt Bldg Room W-606, Padualaan 8, NL-3584 CH Utrecht, Netherlands.

## ARTICLE INFO

### Key words :

clotrimazole  
endocrine disruption  
spermatogenesis  
steroidogenesis  
HPG axis  
zebrafish

## ABSTRACT

Clotrimazole is an azole fungicide used as pharmaceutical that is known to inhibit cytochrome P450 (CYP) enzymatic activities, including several steroidogenic CYP. In a previous report, we showed that a 7 days exposure to clotrimazole induced the expression of genes related to steroidogenesis in the testes as a compensatory response, involving the activation of the Fsh/Fshr pathway. In this context, the aim of the present study was to assess the effect of *in vivo* 21 days chronic exposure to clotrimazole (30 – 197 µg/L) on zebrafish testis function, i.e. spermatogenesis and androgen release. The experimental design combined (i) gene transcript levels measurements along the brain-pituitary-gonad axis (ii) 11-ketotestosterone quantification in blood and (iii) histology of the testes, including morphometric analysis. The chronic exposure led to an induction of steroidogenesis-related genes and *fshr* in the testes as well as *fshb* in the pituitary. Moreover, increases of the gonado-somatic index and of the volume proportion of interstitial Leydig cells were observed in clotrimazole-exposed fish. In accordance with these histological observations, the circulating concentration of 11-KT had increased. Morphometric analysis of the testes did not show an effect of clotrimazole on meiotic (spermatocytes) or postmeiotic (spermatids and spermatozoa) stages, but we observed an increase in the number of type A spermatogonia, in agreement with an increase in mRNA levels of *piwill*, a specific molecular marker of type A spermatogonia. Our study demonstrated that clotrimazole is able to affect testicular physiology and raised further concern about the impact of clotrimazole on reproduction.

## 1. Introduction

Spermatogenesis is a cyclic and tightly regulated developmental process during which a small number of spermatogonial stem cells proliferate and differentiate to form spermatozoa (Nobrega et al. 2009; Schulz et al. 2010). These germ cells can only survive and develop in close and continuous relationship with Sertoli cells (Matta et al. 2002). Spermatogenesis is supported by testicular steroidogenesis, a multi-step process involving a cascade of enzymatic reactions and producing steroid hormones (Miller 1988; Parker and Schimmer 1995) that control various physiological functions (Miller 1988). Spermatogenesis and steroidogenesis are under control of the hypothalamus-pituitary-gonad (HPG) axis: hypothalamic gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) stimulate release of pituitary gonadotropins, luteinizing hormone (Lh) and follicle-stimulating hormone (Fsh), that interact with their gonadal G protein-coupled receptors, Fsh receptor (Fshr) and Lh receptor (Lhr), and

androgenic sex steroids synthesized in Leydig cells interact with the androgen receptor (Ar) expressed by Sertoli or interstitial somatic cells in the testis (Burns and Matzuk 2002; Kumar 2005; Petersen and Soder 2006; Pierce and Parsons 1981). In fish, testicular expression sites of gonadotropin receptors overlap in Sertoli and Leydig cells (Garcia-Lopez et al. 2009; Ohta et al. 2007) and Fsh is a potent steroidogenic hormone (Kazeto et al. 2008; Planas et al. 1993). Fsh activates the Fshr on Leydig and Sertoli cells to control steroidogenesis and spermatogenesis, respectively (Garcia-Lopez et al. 2009; Garcia-Lopez et al. 2010; Ohta et al. 2007; Schulz et al. 2010). In male fish, Leydig cells produce 11-oxygenated androgens, such as 11-ketotestosterone (11-KT), which stimulates spermatogenesis (Miura et al. 1991). Sertoli cells but not germ cells expressed functional receptors for both androgens and Fsh, so these cells act as regulatory interface between the endocrine system and the germ cells (Petersen and Soder 2006).

Azole fungicides inhibit cytochrome P450 (CYP) 51, 14 $\alpha$ -lanosterol demethylase, disrupting ergosterol synthesis and increasing cell permeability

\*Corresponding author: Brion F. Phone : +33-3 44 55 65 12; Fax : +33-3 44 55 66 05.  
Email : [francois.brion@ineris.fr](mailto:francois.brion@ineris.fr) (Brion F.)



in fungi (Georgopapadakou 1998; Henry and Sisler 1984). Several azole fungicides such as ketoconazole or prochloraz also inhibit other CYP enzyme activities and have the capacity to alter gonadal steroidogenesis and reproductive function in fish (Ankley et al. 2007; Villeneuve et al. 2007a; Zhang et al. 2008a). For example, several azole compounds inhibit steroidogenic cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (Cyp17) and aromatase (Cyp19) in mammals and fish (Ayub and Levell 1987; Heneweer et al. 2004; Hinfray et al. 2006b; Monod et al. 1993; Vinggaard et al. 2000).

In a previous short-term experiment of 7 days, we investigated the effect of clotrimazole, an azole fungicide, on pituitary-gonad axis at the molecular level in adult male zebrafish. Our data showed that clotrimazole induced a biological compensation as revealed by increased expression of steroidogenesis-related genes and protein *de novo* synthesis in Leydig cells while the 11-KT plasma concentration was not affected. Clotrimazole exposure also induced over-expression of pituitary *fsh $\beta$*  and its testicular receptor *fshr*. These results suggested that Fsh/Fshr signalling is involved in the clotrimazole-induced steroidogenesis (Baudiffier et al. 2012; Hinfray et al. 2011). Moreover, this raised the question if also spermatogenesis, a process regulated by androgens and Fsh (McLachlan et al. 2002; Plant and Marshall 2001; Schulz et al. 2010), would be affected by clotrimazole.

Therefore, the present study aimed at assessing the effect of a prolonged chronic *in vivo* exposure of fish on steroidogenesis and spermatogenesis addressing the following questions: (i) Does biological compensation in response to inhibiting enzymatic activities still operate after a chronic exposure? (ii) Does chronic exposure to clotrimazole have a significant effect on spermatogenesis?

For that purpose, adult male zebrafish were exposed 21 days to clotrimazole (30-197  $\mu$ g/L). We first measured the transcript levels of genes along the brain-pituitary-gonad axis, using a combination of genes involved in steroidogenesis and spermatogenesis (**table S1**) as well as concentrations of circulating 11-KT. In testis tissue, expression of steroidogenic acute regulatory protein (*star*); hydroxyl- $\Delta$ -5-steroid dehydrogenase, 3- $\beta$ - and steroid  $\Delta$ -isomerase 1 (*hsd3b1*); cytochrome P450, family 17, subfamily A polypeptide 1 (*cyp17a1*); cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1 (*cyp11c1*; previously referred to as

*cyp11b2*); hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 3a (*hsd11b3a*); cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a (*cyp19a1a*); cytochrome P450, family 19, subfamily B, polypeptide 1a (*cyp19a1b*); luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor (*lhcgrr*); follicle stimulating hormone receptor (*fshr*); were measured. The Sertoli cell markers insulin-like growth factor 3 (*igf3*), anti-müllerian hormone (*amh*) as well as the androgen receptor (*ar*) and the spermatogonial cell marker piwi-like 1 (*piwil1*) were also quantified. In pituitary tissue, expression of beta sub-unit of luteinizing hormone / choriogonadotropin (*lh $\beta$* ) and follicle stimulating hormone (*fsh $\beta$* ) were measured. In brain tissue, expression of gonadotropin-releasing hormones 3 (*gnrh3*) and steroidogenesis-related genes were also assessed. Indeed, in light of the impact of clotrimazole on testicular steroidogenesis, examination of brain steroidogenesis appears interesting to consider. In addition, the expression of drug metabolizing enzymes (DMEs) genes, such as phase I enzymes, i.e. cytochrome P450, family 1, subfamily A polypeptide 1 (*cyp1a1*), cytochrome P450, family 3, subfamily A polypeptide 65 (*cyp3a65*) or phase II conjugating enzymes, i.e. glutathione S-transferase, alpha-like (*gstal*) and glutathione S-transferasepi 1 (*gstp1*) was quantified in the liver (**table S1**). DME enzymes, known to be involved in xenobiotic and drug metabolism, are key enzymes of catabolism for steroid hormones (Lee et al. 2003). Secondly, we assessed effects on spermatogenesis by quantifying the volume fractions of the different germ cell types and of interstitial cells.

## 2. Methods

The experimental design and most of the biological analyses have been described in a previous study (Baudiffier et al. 2012).

### 2.1. Animals and treatments

All experiments were approved by the ethical committee of the National Institute of Industrial Environment and Risks (INERIS). Wild type adult male zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were obtained from our breeding units. Fish were raised on a 14:10 light:dark cycle in a recirculated water system (Tecniplast, France) at  $25.1 \pm 1$  °C. Clotrimazole (CLO) was purchased from Sigma-Aldrich (France) and all the stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich).

Zebrafish were exposed to three concentrations of clotrimazole (30, 67 and 197  $\mu$ g/L) or solvent alone (DMSO, 0.004 % v: v)

for 21 days under semi-static conditions with a total renewal of the contaminated water every days (temperature:  $25 \pm 0.7$  °C; pH:  $8.01 \pm 0.37$ ; conductivity:  $374.5 \pm 27.6$   $\mu$ S/cm; dissolved oxygen:  $5.8 \pm 0.8$  mg/L). Each condition contained 21 fish equally distributed in three replicates 4L-glass tanks. Water samples were collected from each condition at day 11 and day 18 at the time of water renewal ( $t=0$ h) and 24h later ( $t=24$ h).

## 2.2. Fish sampling

At the end of the exposure, fish were sacrificed in ice cold water and blood (2.5 or 5  $\mu$ L) was collected. Liver, pituitary and brain were removed and preserved in RNA later<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, France) for gene expression quantification. Testes were removed, weighted and preserved in RNA later<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, France) or fixed in Bouin's fluid for histological and immunohistochemistry experiments. Testis mass was determined to calculate the gonado-somatic index (GSI, gonad wet mass/total body wet mass x 100).

## 2.3. Measurement of actual clotrimazole concentrations

The protocol was adapted from (Peschka et al. 2007) as described in (Baudiffier et al. 2012). Briefly, clotrimazole concentrations in control and exposure tanks were determined using solid phase extraction (SPE) followed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to UV-Vis detection. An external calibration was used. The limit of detection (LOD) was 0.3  $\mu$ g/L, the limit of quantification was 1.1  $\mu$ g/L and the recovery of clotrimazole was higher than 90 % in all the experiments. The coefficient of variation, calculated from two replicates per condition, range from 0.4 to 18%.

## 2.4. Gene expression analysis

Total RNA was extracted from testis, liver, brain or pituitary using Trizol Reagent (Life Technologies Inc., UK) following manufacturer's instructions and complementary DNA for the real-time PCR reactions was generated using an M-MLV reverse transcriptase (Promega, France). Gene expression was analyzed by means of an Eppendorf realplex 4 Master cycler ep gradient S (Eppendorf, France). Normalization to total RNA in association with calibration to a gene-specific mRNA standard curve was employed in organs. For RNA normalization, total RNA was previously adjusted at the same concentration using a Nanodrop ND-8000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) for all samples before reverse transcription. Standard curves were generated for each gene, using specific primers and samples amplified by classic PCR. The concentration of these standards was measured using a Nanodrop ND-8000 spectrophotometer and adjusted to a concentration of  $10^{-4}$   $\mu$ g/ $\mu$ L of cDNA and then serially diluted from  $10^{-4}$   $\mu$ g/ $\mu$ L to  $10^{-11}$   $\mu$ g/ $\mu$ L. They were run in parallel to the samples to analyse in the rt-PCR to obtain the concentration in  $\mu$ g/ $\mu$ L for each sample from the corresponding Cycle Threshold (Ct) value. This method, excluding housekeeping genes, was described in the literature. Then, a fold change in mRNA was obtained for each gene of clotrimazole-treated fish relatively to the mean value of the control group for the corresponding gene (Huggett et al. 2005; Villeneuve et al. 2007a).

## 2.5. Measurement of 11-KT concentrations

11-KT was quantified in blood samples by means of a competitive ELISA, following the manufacturer's instructions (11-KT EIA Kit, Cayman Chemical Company, U.S.A.). The mean EC50  $\pm$  standard deviation was  $8.6 \pm 0.7$  pg/ml ( $n=6$  independent experiments). The calculated coefficient of variation between assays was 8 %, and the detection limit was  $2.8$  pg/ml  $\pm$  0.3 pg/ml.

## 2.6. Fluorescent immunohistochemistry and histology

After fixation in Bouin's fluid, testis were dehydrated in ethanol, cleared in toluene and embedded in paraffin, according to conventional procedures. Samples were sectioned at 5  $\mu$ m (longitudinal sections). Sections were stained with Haematoxylin-Eosin for histology or mounted on gelatine-coated slides and processed for immunohistochemistry.

Fluorescent immunohistochemistry of Cyp17a1 and Cyp11c1 proteins in zebrafish testes has been performed as previously described (Baudiffier et al. 2012; Hinfray et al. 2011).

For morphometric analysis, the protocol was adapted from (Feitsma et al. 2007). The mass of germ cells and other components (i.e. somatic cells that include Leydig cells, blood and lymphatic vessels, connective tissue and empty spaces) were determined by light microscopy using a 352-intersection grid. Eight fields chosen randomly (3016 points or 8 fields of 352-intersection grid) were scored for each animal. Intersection points were classified as being over one of the following components: type A spermatogonia, type B spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa or other components as defined above. The scores were first expressed as the volume fraction per testis tissue component. The mass (mg) of each testis component was then determined as the product of the testis mass (mg) x volume fraction of spermatogenic parenchyma ( $\sim 0.8$ ) x volume fraction of specific tissue component. The volume fraction of spermatogenic parenchyma was used as a correction factor in order to exclude the mass of the testes capsule, the efferent ducts, and connective tissue associated with testes.

For Leydig cells, their volume fractions were determined by light microscopy using a 713-intersection grid. Eight fields chosen randomly (5704 points or 8 fields of 713-intersection grid) were scored for each animal. Analysis was performed for 5 fish of each condition. Intersection points were classified as being Leydig cells or not. Results were expressed in percentage of Leydig cells compared to the total number of cells. The mass (mg) of Leydig cells was then determined as the product of the testis mass (mg) x volume fraction of spermatogenic parenchyma ( $\sim 0.8$ ) x volume fraction of Leydig cells component. The volume fraction of spermatogenic parenchyma was used as a correction factor in order to exclude the mass of the testes capsule, the efferent ducts, and connective tissue associated with testes.

## 2.7. Data analysis

One way analysis of variance (ANOVA) was performed to test for differences between treatments. Then, differences among treatments were determined using a post hoc test (Tukey Honestly Significant Difference). Normality of the data was



previously assessed using a Shapiro test and homogeneity of variance was also verified using the Bartlett test. Non-normally distributed data were log-transformed prior to analysis and a nonparametric Kruskal Wallis test, followed by a Multiple Comparison test, was used when data did not meet parametric assumptions. For gene expression analysis in the pituitary, a Mann and Whitney U-test was employed to compare gene expression levels between the highest clotrimazole-exposed fish and the control fish only.

Levels of gene expressions were expressed as fold changes relative to the average value of the control. Statistical analyses, including principal component analysis (PCA), were conducted using R<sup>TM</sup> (R 2.13.1, software, R development Core Team). All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance level (p) was fixed at 0.05 (p<0.05 \*; p<0.01 \*\*; p<0.001 \*\*\*).

### 3. Results

#### 3.1. Water chemistry

Concentrations of clotrimazole measured in water just after adding clotrimazole (t= 0h) were 30, 67 and 197  $\mu\text{g/L}$  for the low, medium, and high contaminations, respectively (**table 1**). Concentrations declined by 32, 17 and 22%, respectively, after 24 h (t= 24h). For each condition, two measurements were performed (at day 11 and day 18). The results showed that the concentrations were stable over time and concentrations of exposure. Control water samples were all below the limit of detection, i.e. 0.3  $\mu\text{g/L}$ .

**Table 1:** Clotrimazole concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) measured in water just after contamination (t= 0h) and 24h later (t= 24h)

	Solvent control	contamination		
		low	medium	high
t0h	< LOD	30.2 $\pm$ 1.6	66.8 $\pm$ 0.3	197.3 $\pm$ 6.4
t24h	< LOD	20.5 $\pm$ 0.8	55.5 $\pm$ 7.1	153.6 $\pm$ 3.0

LOD = Limit of detection

#### 3.2. Biometric parameters

No mortality or any abnormal behavior was recorded in control and clotrimazole-exposed groups during the study. Furthermore, no significant differences were measured among groups for body mass or length (**table 2**). In fish exposed to the highest concentration of clotrimazole, a strong (30%) and significant increase of the GSI was measured as compared to control fish.

#### 3.3. Expression of genes involved in testicular steroidogenesis

Transcriptional levels of steroidogenesis-related genes in testes, i.e. gonadotropin receptors, *star* and several steroidogenic genes were analysed in control and clotrimazole-exposed fish (**Fig.1**). Among nine genes assayed by Q-PCR, an increase in transcription level was observed for five genes after 21 days of exposure to the highest concentration of clotrimazole.

*Fshr* but not *lhcg* expression was significantly 1.69-fold up regulated at the highest concentration of clotrimazole (p = 0.0013). *Star* showed a 1.77-fold increase in transcription level relative to the control with the same treatment (p = 0.0094). Still at the highest concentration of pharmaceutical, the transcription levels of *cyp17a1*, *cyp11c1* and *hsd11b3a* were up-regulated 2.18-, 2.13- and 1.41 fold, respectively (p = 0.00001, p = 0.0015, p = 0.0013). Interestingly, *cyp19a1a* gene expression was down-regulated at 30 and 67  $\mu\text{g/L}$ , and statistical significance was reached in the 67  $\mu\text{g/L}$  clotrimazole-exposed group. However, no effect was observed at the highest concentration.

#### 3.4. Gene expression in brain and pituitary

In brain tissue, transcriptional levels of genes encoding for brain steroidogenic enzymes, estrogen and androgen receptors as well as *gnrh3* were compared between control and clotrimazole-exposed groups (**table 3**). Clear and statistically significant changes in transcript levels were not found for any of the genes at all concentrations of clotrimazole. While a 2 two-fold induction of *cyp19a1a* expression was measured in fish exposed to 30 and 197  $\mu\text{g/L}$  of clotrimazole, the high variability observed between individuals, may contribute to the lack of statistical significance.

In the pituitary, transcript levels of *fsh $\beta$*  and *lh $\beta$*  were assessed for the 197  $\mu\text{g/L}$  clotrimazole-exposed group and compared to untreated fish. We only assessed gonadotropin gene expression at the highest concentration because we observed a strong and significant induction of several steroidogenic-related genes and *fsh $\beta$*  transcript levels in this group. The results showed that *fsh $\beta$*  was increased by 3.6-fold, but expression of *lh $\beta$*  was unchanged (**Fig.2**).

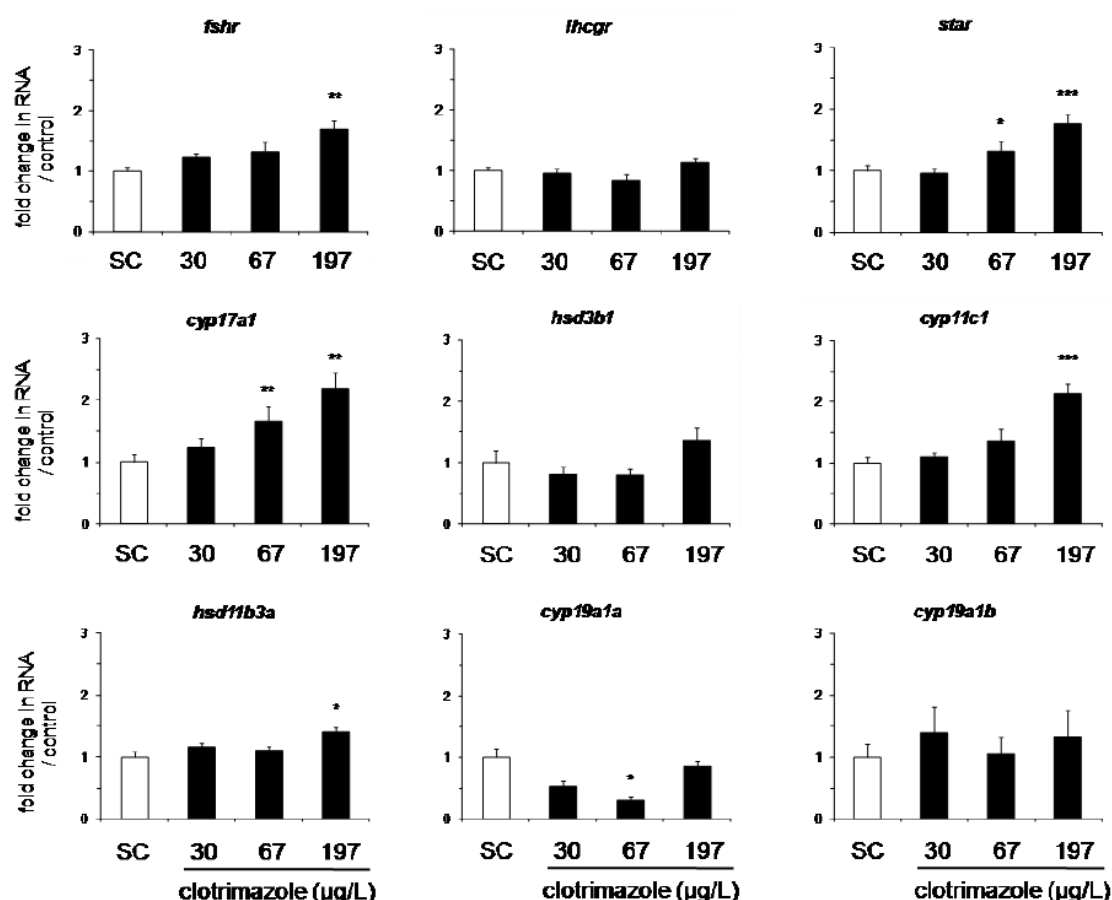
**Table 2:** Biometric parameters of fish after 21 days of chronic treatment with various concentrations of clotrimazole

	Group	N	body weight (mg)	gonad weight (mg)	body length (cm)	GSI (%)
control	solvent	21	486 ± 103	8.3 ± 4.1	3.70 ± 0.27	1.6 ± 0.5
clotrimazole	low (30 µg/L) <sup>†</sup>	20	513 ± 133	8.9 ± 4.0	3.82 ± 0.27	1.7 ± 0.6
	medium (67 µg/L) <sup>†</sup>	21	454 ± 133	8.0 ± 4.7	3.71 ± 0.27	1.6 ± 0.8
	high (197 µg/L) <sup>†</sup>	21	523 ± 119	10.3 ± 3.9	3.83 ± 0.24	2.0 ± 0.9*

<sup>†</sup> Measured concentrations just after adding clotrimazole in water

\* significant difference compared to control group (ANOVA paramétrique  $p \leq 0.05$ )

GSI = Gonado somatic index; N = number of fish



**Fig.1:** Expression of gonadotropin receptors and of genes involved in testis steroidogenesis of adult male zebrafish following a 21 days exposure to clotrimazole. Data are presented as the fold change in gene expression relative to the control (mean ± SEM; n = 9 - 15 fish for each condition). An asterisk indicates a significant difference compared to control group (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

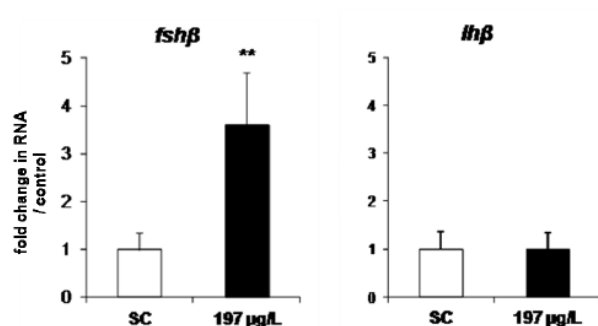
### 3.5. *Cyp17a1* and *Cyp11c1* immunostaining in the testes

Using specific polyclonal antibodies, fluorescent immunohistochemistry was performed in testis sections after 21 days of exposure to assess the

effect of clotrimazole on *Cyp17a1* and *Cyp11c1* protein occurrence (Fig. 3). The two proteins were localized in interstitial Leydig cells and increased immunostaining was observed for both proteins from 67 µg/L of clotrimazole. This increase became very marked at the highest level of pesticide

**Table 3:** Effect of a 21 days exposure to clotrimazole on brain genes expression. Results are presented as ratio of clotrimazole-treated to control fish

Experimental groups	genes											
	<i>star</i>	<i>hsd3b1</i>	<i>cyp17a1</i>	<i>cyp11c1</i>	<i>hsd11b3a</i>	<i>cyp19a1a</i>	<i>cyp19a1b</i>	<i>gnrh3</i>	<i>ar</i>	<i>esr1</i>	<i>esr2b</i>	<i>esr2a</i>
Solvent control	1 ± 0.20	1 ± 0.25	1 ± 0.20	1 ± 0.28	1 ± 0.23	1 ± 0.29	1 ± 0.22	1 ± 0.27	1 ± 0.10	1 ± 0.11	1 ± 0.14	1 ± 0.11
Clotrimazole 30 µg/L	0.99 ± 0.17	0.83 ± 0.16	0.71 ± 0.06	0.80 ± 0.06	1.32 ± 0.23	2.34 ± 0.28	1.42 ± 0.41	0.72 ± 0.15	0.84 ± 0.06	1.35 ± 0.07	0.92 ± 0.08	0.85 ± 0.06
Clotrimazole 67 µg/L	1.05 ± 0.31	0.72 ± 0.19	0.64 ± 0.10	0.58 ± 0.15	1.02 ± 0.32	1.26 ± 0.33	0.86 ± 0.40	0.38 ± 0.11	0.86 ± 0.13	0.91 ± 0.13	0.84 ± 0.12	0.74 ± 0.11
Clotrimazole 197 µg/L	1.28 ± 0.06	1.20 ± 0.27	1.05 ± 0.08	0.84 ± 0.06	1.07 ± 0.17	1.97 ± 0.47	0.73 ± 0.21	0.58 ± 0.13	0.99 ± 0.06	1.18 ± 0.21	1.02 ± 0.14	1.17 ± 0.15



**Fig.2:** Expression of gonadotropins beta sub-unit genes (*fshβ* and *lhβ*) in pituitary of adult male zebrafish following a 21 days exposure to clotrimazole (197 µg/L). Data are presented as the fold change in gene expression relative to the control (mean ± SEM; n = 14 - 18 fish for each condition). An asterisk indicates a significant difference compared to control group (\* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01).

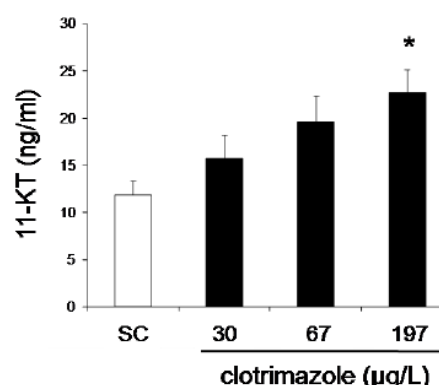
treatment (197 µg/L) especially for the *Cyp11c1* protein (**Fig.3A and .3B**). These results are in accordance with the data on *cyp17a1* and *cyp11c1* genes expression.

### 3.6. 11-ketotestosterone concentrations in blood

Clotrimazole significantly affected blood 11-KT concentrations as compared to the control group (**Fig.4**). A concentration-dependent increase was measured with a significant effect at the highest concentration of clotrimazole. Otherwise, we noticed an increased inter-individual variation in clotrimazole-exposed groups.

### 3.7. Expression of spermatogenesis-related genes

Transcription of genes involved in spermatogenesis was assessed in testes of control and clotrimazole-exposed fish after 21 days of exposure (**Fig.5**).



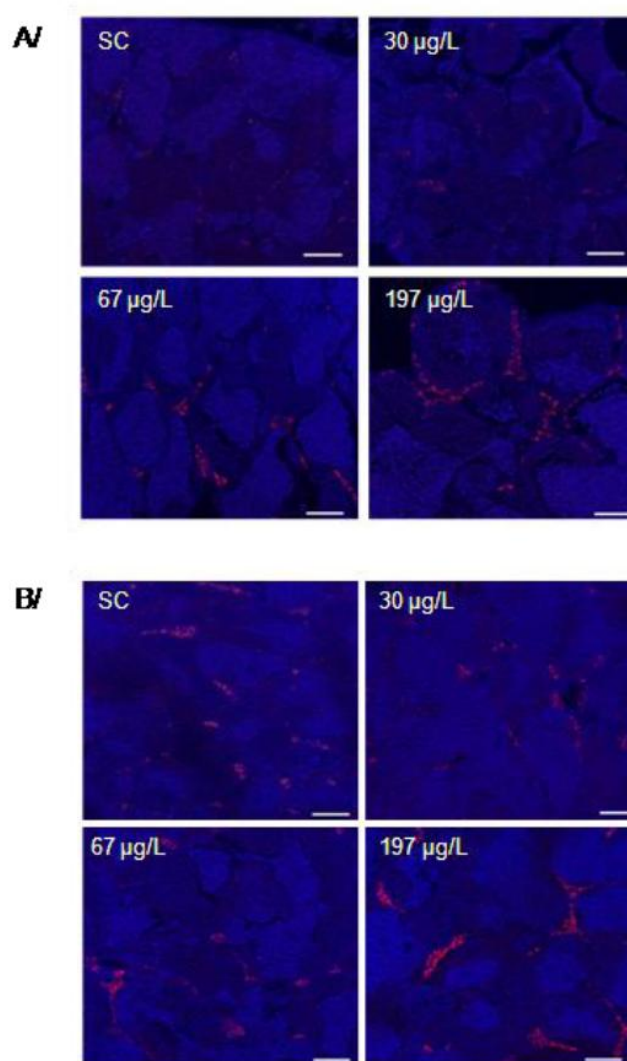
**Fig.4:** Plasma concentrations of 11-KT in adult male zebrafish following a 21 days exposure to clotrimazole. Data are expressed in ng/ml (mean ± SEM; N = 15 - 21 fish /condition). 11-KT= 11 ketotestosterone (\* p ≤ 0.05).

The androgen receptor *ar* that is expressed in Sertoli and interstitial cells but not in germ cells was significantly up-regulated for all clotrimazole treatments (1.33-fold for 197 µg/L, p = 0.0007). Transcriptional levels of the two Sertoli cells markers *amh* and *igf3* were also examined. Anti-müllerian hormone *amh* expression was unchanged whereas *igf3* expression was induced in the 67 µg/L clotrimazole-exposed group (p = 0.02) but not at the highest clotrimazole concentration. Finally, transcript level of the spermatogonial marker *piwill* was significantly up-regulated at the highest clotrimazole concentration (1.38-fold for 197 µg/L).

### 3.8. Expression of genes involved in the catabolism of steroid hormones

Transcript levels of different genes encoding for drug metabolizing enzymes (DMEs) were assessed after 21 days of exposure in testis and in liver (**Fig.S1, Fig.S2**). In the liver, transcriptional levels





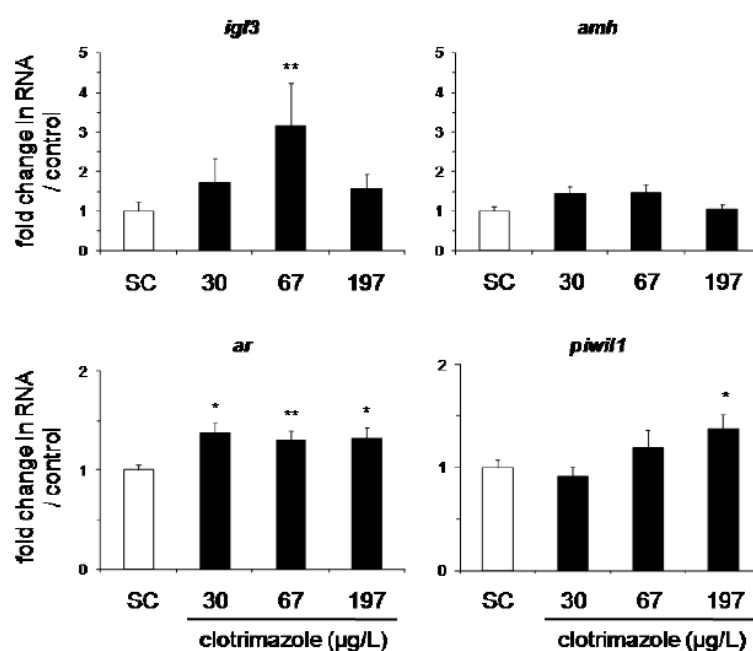
**Fig.3:** Change in (A) Cyp17-I- and (B) Cyp11c1 protein labelling in zebrafish testes by fluorescent immunohistochemistry after a 21 days exposure to clotrimazole. Immunoreactivity was localized in Leydig cells and observed in all groups. Red: P450c17 or P450c11B immunostaining, blue: Hoechst staining. (N = 6 fish /condition). Scale Bars = 50 µm (white).

of phase I DMEs, i.e. *cyp11a* and *cyp3a65*, and of phase II conjugating enzymes, i.e. *gstA1* and *gstP1*, remained unchanged in clotrimazole-exposed groups compared to the control group (**Fig.S1**). However, in testis, *cyp3a65* expression was significantly up-regulated (**Fig.S2**).

### 3.9. Principal Component analysis (PCA)

A PCA was performed in order to have an overview of correlations between the different endpoints measured in the testis and in the blood (**Fig.6**). The factor 1 explained 34.02% of the data variability whereas the factor 2 explained 16 % of the data variability. A plot with respect to this two principal

components revealed that expression of all endpoints influenced variation in the negative direction along factor 1. Interestingly, along factor 2, we observed a relationship between several steroidogenesis-related genes, spermatogenesis markers, i.e. *igf3* and *piwill*, as well as 11-KT and GSI (**Fig.6A**). A second plot, representing condition of exposures, showed a strong difference between the 197 µg/L clotrimazole-exposed groups that influenced variation along factor 1 compared to the other groups including control and the two other clotrimazole-exposed groups (**Fig.6B**). That probably explains why all the endpoints were localized negatively along factor 1.



**Fig. 5:** Expression of Sertoli and germ cells localized-genes in testes of adult male zebrafish following a 21 days exposure to clotrimazole. Data are presented as the fold change in gene expression relative to the control (mean  $\pm$  SEM,  $n = 11 - 15$  fish for each condition). An asterisk indicates a significant difference compared to control group (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ ).

### 3.10. Histology and morphometric analysis of the testes

Histological analysis showed an enlargement of interstitial spaces in fish exposed to clotrimazole, as indicated by white arrows (**Fig.7A**, control; **Fig.7B**, 197  $\mu\text{g/L}$  clotrimazole). Interestingly, morphometric analysis revealed a significant 2-fold increase of Leydig cells mass (**Fig.7C**). Finally, quantitative morphometric analysis of testis tissue components was realized in 197  $\mu\text{g/L}$  clotrimazole-exposed group and control group (seven males for each group). We focused on the highest clotrimazole-exposed fish since the most clear treatment effects regarding Leydig cells, target gene expression or GSI were found in this group. In control individuals, the mass of germ cells, i.e. spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa, agrees with previously reported data in adult male zebrafish (de Waal et al. 2009). In exposed-fish, a significant 2-fold increase of type A spermatogonia (but not type B) was quantified (**Fig.7D**).

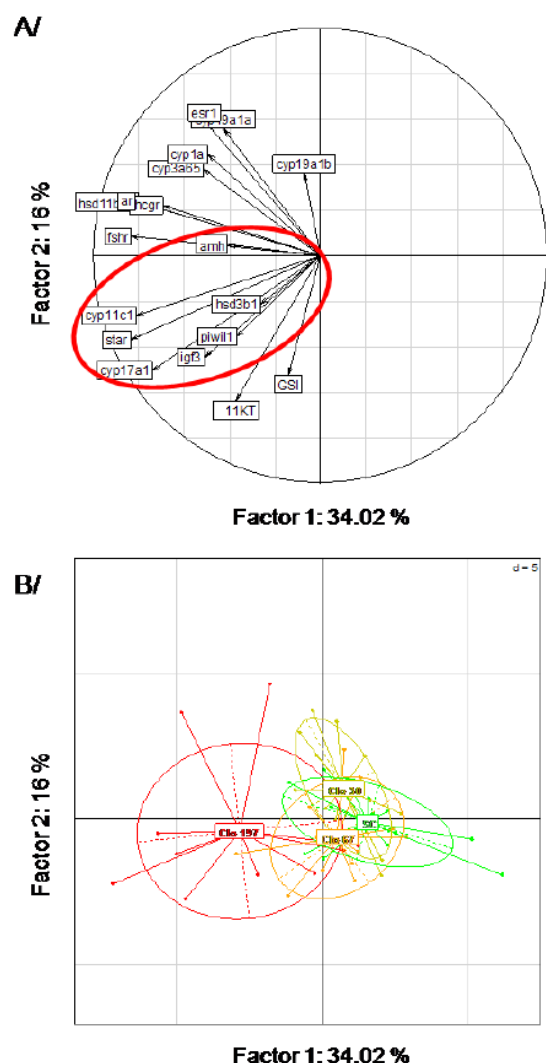
## 4. Discussion

The present work investigated the chronic effects of clotrimazole on two related process, testicular steroidogenesis and spermatogenesis, after 21 days

of exposure of zebrafish. A biological compensation of the steroidogenic enzymes inhibition by clotrimazole was revealed, with an up-regulation of genes coding for steroidogenic enzymes, pituitary *fsh $\beta$* , and its testicular receptor *fshr*. This underlines the critical role of the Fsh/Fshr signalling pathway in mediating the effects of clotrimazole on testicular steroidogenesis. In accordance with inducing Leydig cell steroidogenesis and stimulating the Fsh/Fshr pathway, transcript levels of the Sertoli cell genes *igf3* and *ar* were increased, as well as the 11-KT circulating levels. Furthermore, morphometric analysis of the testes demonstrates that spermatogenesis was impacted by clotrimazole as shown by the increase of the mass of type A spermatogonia in clotrimazole-exposed fish, in accordance with the up-regulation of a marker gene for this germ cell type, *piwil1*.

### 4.1. Chronic exposure to clotrimazole led to activation of Fsh/ FshR signalling and over-compensation of the steroidogenic parameters

In the present study, we investigated the effects of clotrimazole on the brain-pituitary-gonadal axis, in particular the impact on testicular steroidogenesis

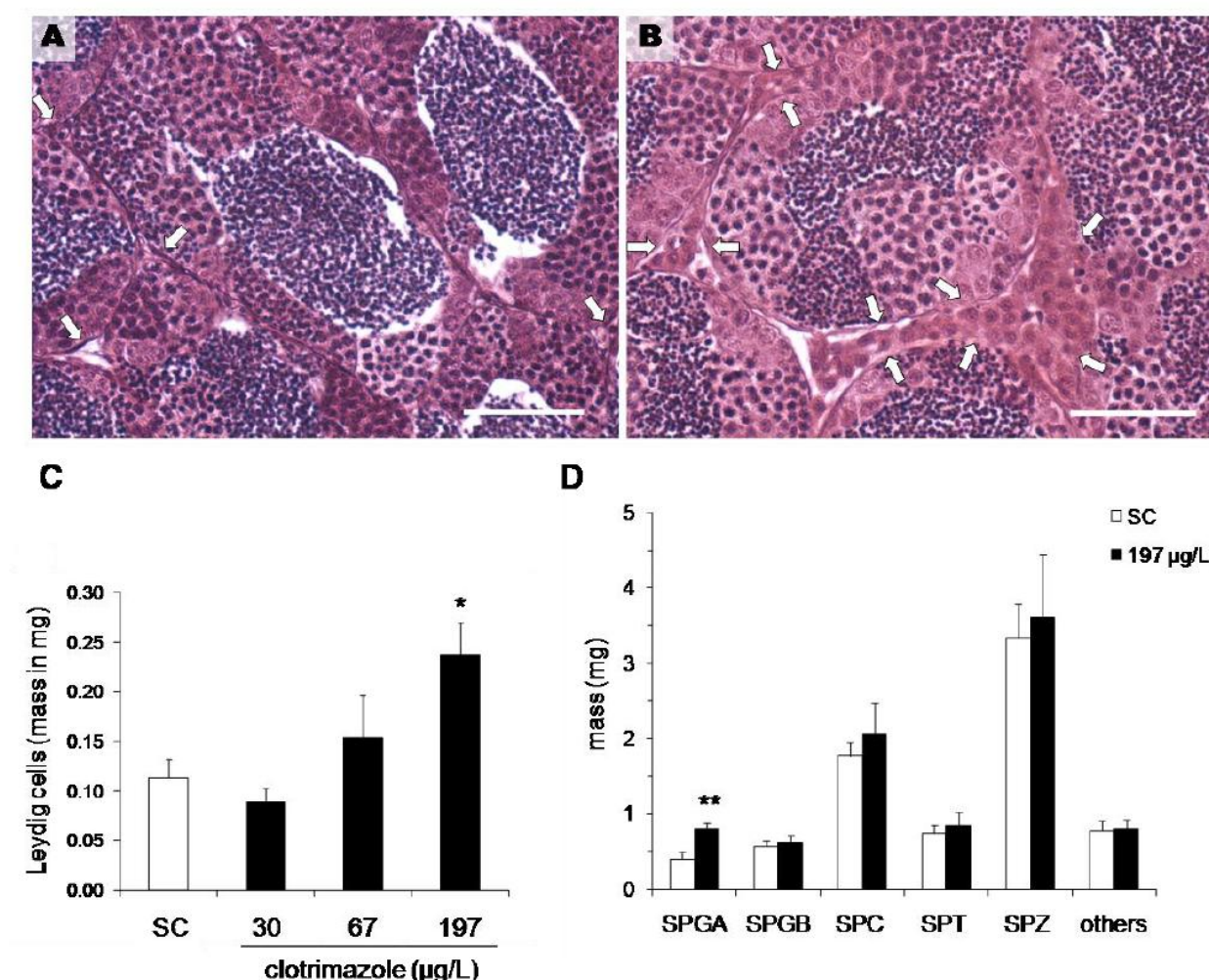


**Fig. 6:** Principal Component Analysis (PCA) of testicular gene expressions data as well as GSI and plasma concentration of 11-KT in adult male zebrafish for control fish and clotrimazole-exposed fish: figure 6A is a plot of the two dimensional PCA and figure 6B is a trajectory plot representing each treatment groups. The 95% confidence ellipses were drawn around each group (green: solvent control, yellow: clotrimazole 30 µg/L, brown: clotrimazole 67 µg/L, red: clotrimazole 197 µg/L).

after 21 days of exposure. We showed that clotrimazole up-regulated the expression of steroidogenesis-related genes, i.e. *star*, *cyp17a1*, *cyp11c1*. Principal Component Analysis (PCA) revealed that these endpoints were correlated. Cyp17a1 and Cyp11c1 protein expression were also increased in Leydig cells. In addition, circulating 11-KT blood concentration was markedly increased. Induction of steroidogenesis-related genes agrees

with recent work on adult male fathead minnow or medaka exposed 21 days to azoles, i.e. ketoconazole or prochloraz (Ankley et al. 2007; Villeneuve et al. 2007a). Clotrimazole is known to inhibit several CYP enzyme activities in fish and mammals; including Cyp19 and Cyp17 (Ayub and Levell 1987; Hinfrey et al. 2006b; Monod et al. 1993; Schuster 1985). This inhibition of enzymatic activities in testis tissue can lead to the inhibition of 11-KT release, as noticed in an *in vitro* zebrafish testicular explant culture system (Hinfrey et al. 2011). For that reason, *in vivo* steroidogenesis induction was interpreted as a biological compensation in response to enzyme inhibition (Ankley et al. 2007; Baudiffier et al. 2012; Hinfrey et al. 2006b; Villeneuve et al. 2007b; Zhang et al. 2008a). However, in the present study, we observed an increase of circulating 11-KT concentrations, suggesting that a 21 days exposure to clotrimazole led to an over-compensation. We postulate that clotrimazole initially depressed plasma androgen levels, provoking a compensatory response via Fsh, including an increased *de novo* synthesis of steroidogenic enzymes, such that 11-KT blood levels were normal after 7 days of exposure (Baudiffier et al. 2012), but exceeded normal levels after 21 days of exposure (present study). In recent works on adult male fathead minnows exposed 21 days to ketoconazole or fadrozole, plasma concentration of 11-KT was not affected (Ankley et al. 2007) or induced (Ankley et al. 2002), respectively. In mammals, plasma and intra-testicular concentrations of testosterone were increased following long-term exposure to azoles (table 4). Taken together, these studies and our study suggest that the relationship between azole exposures and final androgen plasma concentrations cannot easily be predicted. This is probably due to the balance between a direct inhibition of enzyme activities and a compensatory response that stimulates testicular steroidogenic gene expression by gonadotropin. The impact of azole on plasma 11-KT may also depend on the biological model, the tested azole, or the exposure conditions (concentration and duration). Furthermore, the 11-KT concentration is a result of its production, degradation, and excretion. So, an important point to consider is steroid hormone degradation (Lou et al. 2004) by DME, expressed in the liver but also in the gonads. For example, in the present study, we observed an induction of *cyp3a65* mRNA transcript level in testes of the group exposed to the highest clotrimazole concentration. This increased gene





**Fig.7:** Zebrafish testicular structure following a 21 days exposure to 197 μg/L clotrimazole: zebrafish testis sections from control fish (A), or from clotrimazole-exposed fish (B). % of Leydig cells in testicular tissue from control fish or clotrimazole-exposed fish (n=3-5) (C). Morphometric analysis (D) of zebrafish testis sections from control group (n = 7) or from the 197 μg/L clotrimazole-exposed group (n = 7) following a 21 days exposure. Data are represented as mass (mg) of testicular cell types: SPGA: spermatogonia A, SPGB: spermatogonia B, SPC: spermatocytes, SPT: spermatids, SPZ: spermatozoa and others.

expression could lead to Cyp3a65 enzyme production and influence circulating 11-KT concentrations. In addition, we noticed an inhibition of *cyp19a1* aromatase in the testes following clotrimazole contamination whereas other CYP enzymes involved in androgen production were induced, i.e. *cyp17a1* and *cyp11c1*. Reduced aromatisation of androgens could contribute to increasing substrate availability for 11-KT synthesis.

The increase in testicular *fshr* and pituitary *fshβ* expression is consistent with a compensatory response supporting the role of Fsh/Fshr-signalling in the clotrimazole-induced steroidogenesis, as demonstrated in our previous 7-days experiment (Baudiffier et al. 2012), if the assumed initial decrease of plasma 11-KT concentration would stimulate pituitary Fsh synthesis. However, a change in *gnrh3* expression, the key regulator of gonadotropin synthesis and release in teleost species

**Table 4 :** Morphometric analysis of the testes following several azole or triazole exposures and impact on GSI

reference	species	azole	time of exposure	concentration / duration	steroidogenesis	T / 11-KT	GSI and morphometric analysis of the gonads
Brown - 2011	zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	clotrimazole (CYPs inhibitor)	juvenile to adult (37 - 133 dph)	2.9 and 43.7 µg/L (96 days)	<i>hsd17b3, cyp19a1a</i> (-)	11-KT reduced	- increase in the GSI - increase in the proliferation of Leydig cells - germ cell development was significantly more advanced based on the proportions of spermatids and spermatozoa compared with spermatocytes and spermatogonia
Hinfray - 2011	zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	clotrimazole (CYPs inhibitor)	adult	50 - 500 µg/L (7 days)	<i>cyp17a1</i> (++)	11-KT unchanged	- spermatogonia type A were observed more frequently
Baudiffier - 2012	zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	clotrimazole (CYPs inhibitor)	adult	71 - 258 µg/L (7 days)	<i>star, cyp17a1, cyp11c1</i> (++)	11-KT unchanged	
Ankley - 2007	fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	ketokonazole (CYPs inhibitor)	adult	6 - 400 µg/L (21 days)	<i>cyp17a1</i> and <i>cyp17a1</i> (++)	T unchanged	- increase in the GSI - marked proliferation of interstitial (Leydig) cells - interstitial cells have more rounded nuclei and more cytoplasm
Ankley - 2002	fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	fadrozole (aromatase inhibitor)	adult	2 - 50 µg/L (21 days)	not measured	T / 11-KT induced	- increase in the GSI - enlarged seminiferous tubule, accumulation of sperm in the testes - lack of germinal epithelium
Panter - 2004	fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	fadrozole (aromatase inhibitor)	adult	51.7 - 95.5 µg/L (21 days)	not measured	not measured	- increase in the GSI
Navarro-Martin - 2009	sea bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	fadrozole (aromatase inhibitor)	sexually undifferentiated (90–150 dph)	100 mg kg <sup>-1</sup> food twice a day (60 days)	not measured	not measured	- increase in the GSI
Goetz - 2009	rat	triadimefon (CYPs inhibitor)	adult	126 mg/kg body weight/day (30 days)	not measured	T induced (plasma and intra-testicular)	- no change in the gonad weight
Turner - 2000	rat	anastrozole (aromatase inhibitor)	adult	200 mg/L (63 days)	not measured	T induced (plasma and intra-testicular)	- increase in the GSI - spermatogenesis was grossly normal - 10% of rats had testes that appeared to contain only Sertoli cells

GSI: Gonado Somatic Index; dph: days post hatch



possessing two *Gnrh* variants (Kobayashi et al. 1997; Steven et al. 2003), was not demonstrated in our study.

As clotrimazole can directly inhibit CYP activities in testes (Ayub and Levell 1987; Hinfray et al. 2006a; Monod et al. 1993), it was also interesting to investigate the effects of clotrimazole on brain steroidogenesis. Indeed, in teleost fish, the brain possesses high aromatase activity (Pasmanik and Callard 1985) due to the strong expression of the *cyp19a1b* gene coding for aromatase B protein in radial glial cells (Forlano et al. 2001; Menuet et al. 2005). Furthermore, a recent study suggested that radial glial cells express the whole set of key steroidogenic enzymes necessary to produce active steroids from cholesterol (Diotel et al. 2011). Our data showed that clotrimazole had no effect on expression of steroidogenesis-related genes in brain tissue. However, considering that these genes are expressed in specific area of the brain, we cannot exclude a dilution effect has masked possible, more subtle changes, since mRNA levels were measured in the whole brain.

#### 4.2. Biological relevance of Fsh-driven clotrimazole-disrupted steroidogenesis on spermatogenesis

In the present study, we assessed the effect of clotrimazole on testicular physiology, i.e. steroidogenesis and spermatogenic function at the histological and molecular level. Morphometric analysis of germ cells showed a significant effect in the number of type A spermatogonia in the 197 µg/L clotrimazole-treated fish compared to control fish. This result is in agreement with the induction of the germ cell marker *piwil1* expression (formerly known as *ziwi*), which is a component of a germline-specifying structure called nuage and expressed strongly and exclusively in type A spermatogonia of zebrafish (Chen SX et al. *submitted*). This increase of type A spermatogonia could be related to molecular changes in Sertoli cells, which are in close contact with germ cells and provide physical, nutritional and regulatory support to the developing germ cells (Griswold 1995; Petersen and Soder 2006). It is also of interest to notice that Sertoli cells that express the highest level of *ar* mRNA, are in contact with early spermatogonia (de Waal et al. 2008). This is consistent with the notion that these

Sertoli cells respond to 11-KT, resulting in a stimulation of spermatogonial proliferation and differentiation (de Waal et al. 2008; Miura et al. 2001a; Miura et al. 1991). Furthermore, it has been demonstrated in eel testes that *fshr* is mainly expressed in Leydig cells and high Fshr immunoreactivity was found in Sertoli cells surrounding type A and B spermatogonia (Ohta et al. 2007). In the present study, the observed increase in the mass of type A spermatogonia in adult male zebrafish is in agreement with an induction of the *ar* and *fshr* mRNA.

In accordance with an Fsh/Fshr signalling activation, we also observed an induction of *igf3*, which is under the control of Fsh and androgens in Sertoli cells. *Igf3* has been recently discovered in zebrafish, medaka and Nile tilapia and is specifically expressed in gonadal tissue (Wang et al. 2008). *Igf3* belongs to insulin growth factor (IGF) family, which is known to stimulate spermatogenesis in vertebrates (Le Roy et al. 1999), including fish (Loir 1999).

An important result of our study was that morphometric analysis clearly demonstrated an increase in the mass of Leydig cells in clotrimazole-exposed fish. This is in accordance with an increase in circulating 11-KT concentrations and illustrates the stimulation of the steroidogenic system triggered by the Fsh/Fshr pathway. At present, it is not known why elevated Fsh-signalling and androgen levels did not result in an increase in the mass of the postmeiotic germ cells, i.e. spermatids and spermatozooids. As shown in **table 4**, an increased mass of interstitial Leydig cell has also been observed in fish exposed to clotrimazole and ketoconazole (Ankley et al. 2007; Brown et al. 2011), but the precise mechanism of action has not been described. It seems reasonable to assume that an increase in Leydig cell volume can partially explain the elevation of circulating 11-KT concentrations, as these cells are responsible for androgen production.

In conclusion, this study showed that expression of steroidogenesis-related genes in testicular tissue remained induced after 21 days of exposure. Induction of *fshβ*, *fshr* and *igf3* is consistent with and activation of Fsh/Fshr signalling in stimulating Leydig cells steroidogenesis. In comparison with 7 days-exposure period to clotrimazole, we observed

in the present study an induction of blood 11-KT concentrations after 21 days of exposure. In parallel, an increase of GSI and a duplication of the mass of Leydig cells were observed. This over-compensation was not followed by a strong disruption of spermatogenesis as the proportion of germ cells remained largely unchanged, except for an increase in the early spermatogonial generations. This study highlights the relevance of studying a network of functional genes along the brain-gonad axis in parallel with histological analysis at the testicular level to study the effect of clotrimazole as an endocrine disruptor. The present study contributes to progress in our understanding of the molecular mechanisms of clotrimazole and its impact on testis physiology.

## Acknowledgments

This work was funded by a grant of the French ministry of Ecology P189-NEMO to FB, and by the European Union LIFECYCLE projects n° FP7-222719 to RWS. DB was supported by a doctoral fellowship from ANRT and INERIS. We thank Dr. Alexis Fostier (INRA, Rennes, France) for comments on the manuscript. We thank Benjamin Piccini for his technical assistance.

## References

Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Makynen EA, Blake LS, Greene KJ, Johnson RD, Villeneuve DL (2007) Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): Reproductive toxicity and biological compensation. *Environ Toxicol Chem* 26 (6):1214-1223

Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002) Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci* 67 (1):121-130

Ayub M, Levell MJ (1987) Inhibition of Testicular 17-Alpha-Hydroxylase and 17,20-Lyase but Not 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase-Isomerase or 17-Beta-Hydroxysteroid Oxidoreductase by Ketoconazole and Other Imidazole Drugs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 28 (5):521-531. doi:10.1016/0022-4731(87)90511-5

Baudiffier D, Hinfray N, Vosges M, Creusot N, Chadili E, Porcher J-M, Schulz RW, Brion F (2012) A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish. *Toxicology* 298 (1-3):30-39

Brown AR, Bickley LK, Le Page G, Hosken DJ, Paull GC, Hamilton PB, Owen SF, Robinson J, Sharpe AD, Tyler CR (2011) Are Toxicological Responses in

Laboratory (Inbred) Zebrafish Representative of Those in Outbred (Wild) Populations? - A Case Study with an Endocrine Disrupting Chemical. *Environ Sci Technol* 45 (9):4166-4172. doi:10.1021/es200122r

Burns KH, Matzuk MM (2002) Minireview: Genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology* 143 (8):2823-2835. doi:10.1210/en.143.8.2823

Chen SX, Bogerd J, Schoonen NE, Martijn J, de Waal PP, Schulz RW Progesterone stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. Submitted to *Gen Comp Endocrinol*

de Waal PP, Leal MC, Garcia-Lopez A, Liarte S, de Jonge H, Hinfray N, Brion F, Schulz RW, Bogerd J (2009) Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *J Endocrinol* 202 (2):287-297. doi:10.1677/joe-09-0050

de Waal PP, Wang DS, Nijenhuis WA, Schulz RW, Bogerd J (2008) Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Reproduction* 136 (2):225-234. doi:10.1530/rep-08-0055

Diotel N, Do Rego JL, Anglade I, Vaillant C, Pellegrini E, Gueguen MM, Mironov S, Vaudry H, Kah O (2011) Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. *Eur J Neurosci* 34 (1):45-56. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07731.x

Feitsma H, Leal MC, Moens PB, Cuppen E, Schulz RW (2007) Mlh1 deficiency in zebrafish results in male sterility and aneuploid as well as triploid progeny in females. *Genetics* 175 (4):1561-1569. doi:10.1534/genetics.106.068171

Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH (2001) Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: Aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci* 21 (22):8943-8955

Garcia-Lopez A, Bogerd J, Granneman JCM, van Dijk W, Trant JM, Taranger GL, Schulz RW (2009) Leydig Cells Express Follicle-Stimulating Hormone Receptors in African Catfish. *Endocrinology* 150 (1):357-365. doi:10.1210/en.2008-0447

Garcia-Lopez A, de Jonge H, Nobrega RH, de Waal PP, van Dijk W, Hemrika W, Taranger GL, Bogerd J, Schulz RW (2010) Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular Expression Patterns of Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Testis and Unexpected Functional Differentiation of the Gonadotropins. *Endocrinology* 151 (5):2349-2360. doi:10.1210/en.2009-1227

Georgopadarakou NH (1998) Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1 (5):547-557. doi:10.1016/s1369-5274(98)80087-8

Goetz AK, Rockett JC, Ren H, Thillainadarajah I, Dix DJ (2009) Inhibition of Rat and Human Steroidogenesis by Triazole Antifungals. *Syst Biol Reprod Med* 55:214-226. doi:10.3109/19396360903234045

Griswold MD (1995) Interactions between Germ-Cells and Sertoli Cells in the Testis. *Biol Reprod* 52 (2):211-216. doi:10.1095/biolreprod52.2.211

Heneweer M, van den Berg M, Sanderson JT (2004) A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as



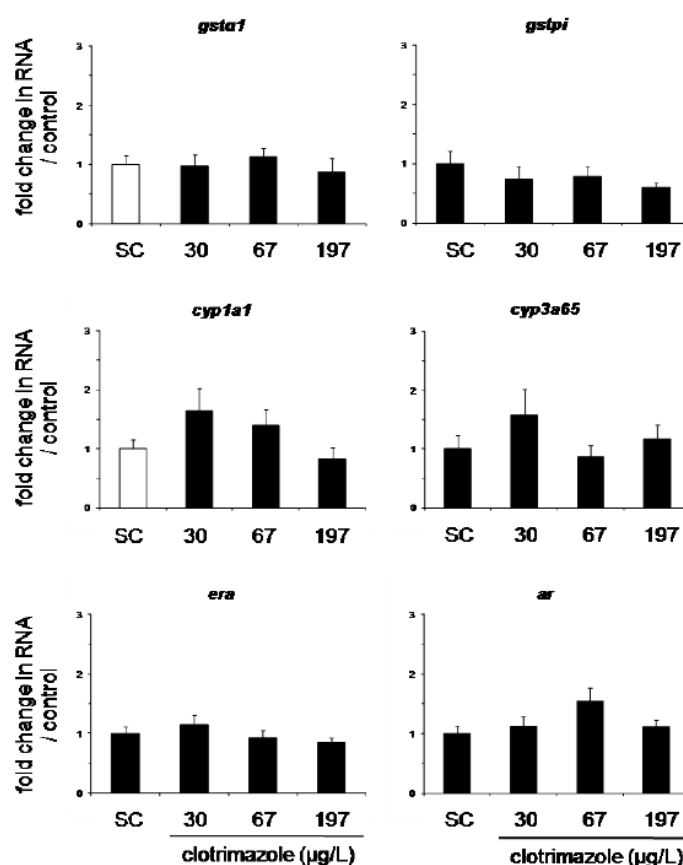
- in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol Lett* 146 (2):183-194. doi:10.1016/j.toxlet.2003.10.002
- Henry MJ, Sisler HD (1984) Effects of Sterol Biosynthesis-Inhibiting (Sbi) Fungicides on Cytochrome-P-450 Oxygenations in Fungi. *Pestic Biochem Physiol* 22 (3):262-275. doi:10.1016/0048-3575(84)90019-1
- Hinfray N, Baudiffier D, Leal MC, Porcher JM, Ait-Aissa S, Le Gac F, Schulz RW, Brion F (2011) Characterization of testicular expression of P450 17 alpha-hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. *Gen Comp Endocrinol* 174 (3):309-317. doi:10.1016/j.ygcen.2011.09.008
- Hinfray N, Palluel O, Turies C, Cousin C, Porcher JM, Brion F Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). In: 12th International Symposium on Toxicity Assessment, Skiathos Isl, GREECE, Jun 12-17 2006a. John Wiley & Sons Inc, pp 332-337. doi:10.1002/tox.20203
- Hinfray N, Porcher JM, Brion F (2006b) Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp Biochem and Physiol C-Toxicology & Pharmacology* 144 (3):252-262
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6 (4):279-284. doi:10.1038/sj.gene.6364190
- Kazeto Y, Kohara M, Miura T, Miura C, Yamaguchi S, Trant JM, Adachi S, Yamauchi K (2008) Japanese Eel Follicle-Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of Biologically Active Recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 Cells and Their Differential Actions on the Reproductive Biology. *Biol Reprod* 79 (5):938-946. doi:10.1095/biolreprod.108.070052
- Kobayashi M, Amano M, Kim MH, Yoshiura Y, Sohn YC, Suetake H, Aida K (1997) Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiol Biochem* 17 (1-6):1-8. doi:10.1023/a:1007764430746
- Kumar TR (2005) What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reproduction* 130 (3):293-302. doi:10.1530/rep.1.00660
- Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT (2003) Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 144: 3382-3398
- Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D (1999) Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69 (1-6):379-384. doi:10.1016/s0960-0760(99)00075-8
- Loir M (1999) Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol Reprod Dev* 53 (4):434-442. doi:10.1002/(sici)1098-2795(199908)53:4<434::aid-mrdr9>3.0.co;2-1
- Lou YR, Qiao S, Talonpoika R, Syvala H, Tuohimaa P (2004) The role of vitamin D-3 metabolism in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92 (4):317-325. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.10.007
- Matta SLP, Vilela DAR, Godinho HP, Franca LR (2002) The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: The tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143 (3):970-978. doi:10.1210/en.143.3.970
- McLachlan RI, O'Donnell L, Stanton PG, Balourdos G, Frydenberg M, de Kretser DM, Robertson DM (2002) Effects of testosterone plus medroxyprogesterone acetate on semen quality, reproductive hormones, and germ cell populations in normal young men. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2):546-556. doi:10.1210/jc.87.2.546
- Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O (2005) Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485 (4):304-320. doi:10.1002/cne.20497
- Miller WL (1988) Molecular-Biology of Steroid-Hormone Synthesis. *Endocr Rev* 9 (3):295-318
- Miura T, Miura C, Yamauchi K (2001a) cDNA cloning of spermatogenesis relating substances and the analysis of their functions in Japanese eel. In: *Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*. Medimond S R L, 40128 Bologna, pp 969-976
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991) Hormonal Induction of All Stages of Spermatogenesis In vitro in the Male Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (13):5774-5778. doi:10.1073/pnas.88.13.5774
- Monod G, Demones A, Fostier A (1993) Inhibition of Ovarian Microsomal Aromatase and Follicular Estradiol Secretion by Imidazole Fungicides in Rainbow-Trout. *Mar Environ Res* 35 (1-2):153-157
- Navarro-Martín L, Blázquez M, Piferrer F (2009) Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation. *Gen Comp Endocrinol* 160 :3-11. doi:10.1016/j.ygcen.2008.10.012
- Nobrega RH, Batlouni SR, Franca LR (2009) An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem* 35 (1):197-206. doi:10.1007/s10695-008-9252-z
- Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T (2007) Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod* 77 (6):970-977. doi:10.1095/biolreprod.107.062299
- Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004) Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development.

- Aquat Toxicol 70 :11–21. doi:10.1016 / j.aquatox. 2004.06.007
- Parker KL, Schimmer BP (1995) Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitam Horm* 51:339-370
- Pasmanik M, Callard GV (1985) Aromatase and 5-Alpha-Reductase in the Teleost Brain, Spinal-Cord, and Pituitary-Gland. *Gen Comp Endocrinol* 60 (2):244-251. doi:10.1016/0016-6480(85)90320-x
- Peschka M, Roberts PH, Knepper TP (2007) Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem* 389 (3):959-968. doi:10.1007/s00216-007-1480-z
- Petersen C, Soder O (2006) The Sertoli cell - A hormonal target and "Super" nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66 (4):153-161. doi:10.1159/000094142
- Pierce JG, Parsons TF (1981) Glycoprotein Hormones - Structure and Function. *Annu Rev Biochem* 50:465-495. doi:10.1146/annurev.bi.50.070181.002341
- Planas JV, Swanson P, Dickhoff WW (1993) Regulation of Testicular-Steroid Production in-Vitro by Gonadotropins (Gth-I and Gth-II) and Cyclic-Amp in Coho Salmon (*Oncorhynchus-Kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 91 (1):8-24. doi:10.1006/gcen.1993.1099
- Plant TM, Marshall GR (2001) The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev* 22 (6):764-786. doi:10.1210/er.22.6.764
- Schulz RW, de Franca LR, Lareyre JJ, Legac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T (2010) Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165 (3):390-411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Schuster I (1985) The Interaction of Representative Members from 2 Classes of Antimycotics - the Azoles and the Allylamines - with Cytochromes-P-450 in Steroidogenic Tissues and Liver. *Xenobiotica* 15 (6):529-546
- Steven C, Lehnen N, Kight K, Ijiri S, Klenke U, Harris WA, Zohar Y (2003) Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *Gen Comp Endocrinol* 133 (1):27-37. doi:10.1016/s0016-6480(03)00144-8
- Turner KJ, Morley M, Atanassova N, Swanson ID, Sharpe RM (2000) Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J Endocrinol* 164:225-238. doi:10.1002/0022-0795(20000164)164:225
- Villeneuve DL, Blake LS, Brodin JD, Greene KJ, Knoebel I, Miracle AL, Martinovic D, Ankley GT (2007a) Transcription of key genes regulating gonadal steroidogenesis in control and ketoconazole- or vinclozolin-exposed fathead minnows. *Toxicol Sci* 98 (2):395-407. doi:10.1093/toxsci/kfm124
- Villeneuve DL, Miracle AL, Jensen KM, Degitz SJ, Kahl MD, Korte JJ, Greene KJ, Blake LS, Linnam AL, Ankley GT (2007b) Development of quantitative real-time PCR assays for fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadotropin beta subunit mRNAs to support endocrine disruptor research. *Com Biochem and Physiol C-Toxicology & Pharmacology* 145 (2):171-183. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.003
- Vinggaard AM, Hnida C, Breinholt V, Larsen JC (2000) Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro* 14 (3):227-234. doi:10.1016/s0887-2333(00)00018-7
- Wang DS, Jiao BW, Hu CJ, Huang XG, Liu ZH, Cheng CHK (2008) Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem Biophys Res Commun* 367 (2):336-341. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.136
- Zhang XW, Hecker M, Jones PD, Newsted J, Au D, Kong R, Wu RSS, Giesy JP (2008a) Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole. *Environ Sci Technol* 42 (17):6762-6769. doi:10.1021/es800591t

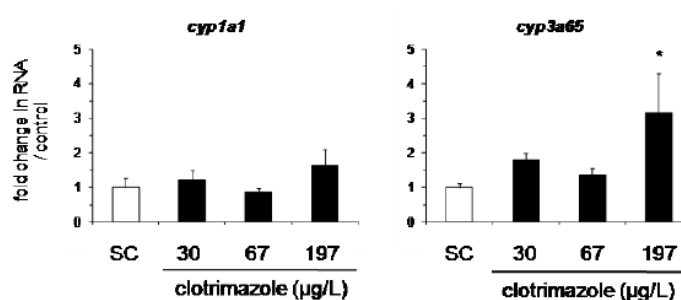
## Supplementary data

**Table S1:** primer sequences of target genes

Name	forward primer sequence (5' --> 3')	reverse primer sequence (5' --> 3')	accession number
<i>star</i>	ACCTGTTTTCTGGCTGGGATG	GGGTCCATTCTCAGCCCTTAC	NM_131663
<i>hsd3b1</i>	GCAACTCTGGTTTCCACACTG	CAGCAGGAGCCGTGTAGCTT	NM_212797.1
<i>cyp17a1</i>	GGGAGGCCACGGACTGTTA	CCATGTGGAAGTGTAGTCAGCAA	NM_212806.3
<i>cyp11c1</i>	GCTCATGCACATTCTGAGGA	TGTGCTGAAGGTGATTCTCG	DQ650710.1
<i>hsd11b3a</i>	TGGTGAAGTATGCCATCGAA	AGTAGCCATCGTGTGTGCTG	AY578180
<i>cyp19a1a</i>	CTGAAAGGGCTCAGGACAA	TGGTCGATGGTGTCTGATG	AF_226620
<i>cyp19a1b</i>	ACTAAGCAAGTCCTCCGCTGTGTACC	TTTAAACATACCTATGCATTGCAGACC	NM_131642.1
<i>lhβ</i>	GCAGAGACACTTACAACAGCC	AAAACCAAGCTCTGAGCAGCC	NM_205622.2
<i>fshβ</i>	CAGATGAGGATGCGTGTGC	ACCCCTGCAGGACAGCC	NM_205624.1
<i>lhcgrr</i>	ATCACTCACGCTCTCCGACT	GCTGCTGACGCCTATTAAGG	NM_205625.1
<i>fshr</i>	GAGGATTCCCAGTAATGCTTTCCT	TCTATCTCACGAATCCCGTTCTTC	NM_001001812.1
<i>ar</i>	ACGTGCCTGGCGTGAAAA	CAAACCTGCCATCCGTGAAC	NM_001083123.1
<i>esr1</i>	GGAGATGCTGGACGCTCA	GCTGCAGCTCCTCCTTTGG	NM_152959.1
<i>esr2b</i>	TGATCCTGCTCAACTCTAATAAC	TCCAGCAGATTGAGCACCTTCCC	NM_174862.3
<i>esr2a</i>	TGATCCTCCTGAACTCCAACA	TCCAGCAGACACAGCAGCTTGGA	NM_180966.2
<i>amh</i>	CTCTGACCTTGATGAGCCTCATTT	GGATGTCCCTTAAGAACTTTTGCA	NM_001007779.1
<i>igf3</i>	GTGCTGCGTTCTCATCCT	TGTTGAGGAGGTTTGGGT	NM_001115050
<i>piwil1</i>	CAAAATGGGAGGAGAGCTGTG	CAAAGAATCGGAGCTGATGC	NM_183338.1
<i>cyp1a1</i>	GACAGGCGCTCCTAAAACAG	CTGAACGCCAGACTCTTTCC	NM_131879.1
<i>cyp3a65</i>	CGGTGCGTACAGTATGGATG	AGAGAGGGTTCAGCAGGTCA	NM_001037438.1
<i>gstal</i>	CGCAGGAAAATACAACCTCTATG	AGCTTCCAGAAGATGAACATCAG	NM_213394.1
<i>gstp1</i>	CAGTTGCCTAAATTTGAAGATGG	AGCTTCCAGAAGATGAACATCAG	NM_131734.3
<i>gnrh3</i>	AAATGGAGGCAACATTCAGG	CCTTCAGCATCCACCTCATT	NM_182887.2



**Fig.S1:** Expression of phase I drug metabolizing enzymes (DMEs) and phase II conjugating enzymes genes as well as steroid receptors in the liver of adult male zebrafish following a 21 days exposure to clotrimazole. Data are presented as the fold change in gene expression relative to the control (mean  $\pm$  SEM;  $n = 3 - 9$  fish for each condition). An asterisk indicates a significant difference compared to control group.



**Fig.S2:** Expression of drug metabolizing enzymes (DMEs) genes in testes of adult male zebrafish following a 21 days exposure to clotrimazole. Data are represented as the fold change in gene expression relative to the control (mean  $\pm$  SEM;  $n = 9 - 10$  fish for each condition). An asterisk indicates a significant difference compared to control group (\*  $p \leq 0.05$ ).

# **Discussion générale**

La présence de PE dans le milieu aquatique suscite de nombreuses interrogations concernant leurs effets sur les organismes aquatiques. Ainsi, depuis une vingtaine d'années, des actions de recherche sont menées dans le but de développer des outils permettant d'évaluer les dangers et les risques liés à l'exposition à ces composés chimiques au niveau de l'organisme et des populations naturelles de poissons.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'inscrit dans la problématique générale des effets des PE sur la reproduction des poissons. Plus précisément, nous nous sommes intéressés aux effets de composés chimiques qui sont connus pour perturber la stéroïdogénèse, un processus biologique clef responsable de la synthèse des hormones stéroïdiennes qui jouent des rôles essentiels dans le développement et la reproduction. Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur le clotrimazole, un fongicide azolé à usage pharmaceutique qui a la capacité d'inhiber l'activité de certaines enzymes de la stéroïdogénèse.

Nos travaux se sont structurés autour d'approches complémentaires. Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si le clotrimazole perturbait la stéroïdogénèse à l'aide de modèles *in vivo* et *in vitro* (**article 1**). Les différences observées entre ces deux modèles, à savoir l'inhibition de la biosynthèse de stéroïde *in vitro* et l'induction de gènes codant pour des enzymes de la stéroïdogénèse *in vivo*, nous ont conduit à nous interroger sur le mécanisme d'action du clotrimazole *in vivo* (**article 2**). Pour répondre à cette question, nous avons sélectionné un ensemble de gènes pour en mesurer l'expression au niveau de l'axe hypophyse-gonade, ce qui nous a permis de démontrer l'implication du système nerveux central dans la réponse biologique au clotrimazole. Plus précisément, nous avons mis en évidence le rôle critique de la gonadotrophine Fsh dans la compensation des effets directs du clotrimazole sur le testicule. Enfin, nous avons voulu aller plus loin en examinant les conséquences d'une exposition au clotrimazole sur la spermatogénèse (**article 3**).

Ce chapitre final a pour objectif de replacer les résultats obtenus dans la problématique générale de cette thèse en montrant quels sont leurs apports dans la compréhension des mécanismes d'action du clotrimazole. Il s'agira également de discuter de manière critique la démarche expérimentale, et enfin de montrer l'intérêt de ce travail dans l'évaluation des dangers et des risques dus aux perturbateurs endocriniens.



## I. Les effets du clotrimazole et les mécanismes sous-jacents en jeu

Pour le moment, les effets des PE les plus étudiés sont ceux médiés par les récepteurs nucléaires stéroïdiens. En revanche, peu d'études se sont attachées à l'étude des effets de substances agissant sur la biosynthèse hormonale. Nous avons montré au cours de ce travail de thèse que le clotrimazole, qui a la capacité d'inhiber l'activité de certaines enzymes de la stéroïdogenèse, pouvait avoir des mécanismes d'action directs ou des mécanismes plus complexes indirects selon le modèle d'étude et le niveau biologique considéré. Ainsi, en utilisant des modèles expérimentaux de plus en plus intégratifs, nous avons mis en évidence un mécanisme d'action original chez le poisson zèbre *in vivo*, avec une compensation de l'organisme en réponse à une action directe du clotrimazole sur le testicule.

Les effets directs ont été observés au niveau de structures élémentaires (1) Même si nous n'avons pas travaillé sur ce modèle durant cette étude, le premier niveau d'intégration est la cellule. C'est par exemple le cas de la lignée H295R, mais aussi de la lignée JEG-3 (Laville *et al.*, 2006). (2) Un second niveau d'intégration est l'organe, dans notre cas la culture d'explants testiculaires. (3) Le dernier niveau, qui a permis d'étudier les effets indirects du clotrimazole est l'organisme entier (le poisson). Dans un contexte expérimental, ce dernier niveau ajoute d'autant plus de complexité que c'est un groupe de plusieurs poissons qui est exposé dans un aquarium. Ainsi, l'absorption de la molécule, et le métabolisme par les autres organismes, c'est-à-dire les congénères mais également des microorganismes, sont à considérer. Par ailleurs, plus le niveau de complexité et d'intégration biologique est élevé, plus l'interprétation des données est délicate, puisqu'il y a davantage de multi-actions possibles, mais aussi de métabolismes (au niveau du foie par exemple) ou encore de régulation de flux.

### I.1. Les effets directs du clotrimazole

Les effets directs du clotrimazole sur la stéroïdogenèse peuvent être évalués au niveau de lignées cellulaires ou bien au niveau d'explants testiculaires.

Tout d'abord, les lignées H295R, issues de cellules cancéreuses de la glande adrénale, sont utilisées depuis une quinzaine d'année comme bio-essai afin d'évaluer la capacité de produits chimiques à moduler la stéroïdogenèse. Les principaux paramètres mesurés sont

l'activité aromatasase, la production de stéroïdes et l'expression de gènes. Ainsi, des expositions à différents azoles ont pour effet majeur une inhibition de la stéroïdogénèse avec en particulier l'inhibition de l'activité aromatasase qui est assez bien référencée (cf **tableau 5**, partie synthèse bibliographique). Une étude a par exemple montré que les imidazoles, dont fait partie le clotrimazole, sont des inhibiteurs de l'activité aromatasase plus puissants que les triazoles, comme le propiconazole (Sanderson et al., 2002). En revanche, ce modèle n'est pas une lignée gonadique et ne provient pas d'un modèle poisson. Le métabolisme cellulaire et les voies de signalisation sont donc assez éloignés de notre modèle d'étude. Par exemple, la mesure de 11-KT, qui est un androgène puissant chez les poissons, est impossible dans le cas de l'étude des cellules H295R.

Le système de culture d'explants testiculaires de poisson zèbre, récemment développé par (Leal et al., 2009) permet de passer à un niveau de complexité supérieur avec la prise en compte de l'ensemble du tissu gonadique. A notre connaissance, notre étude est la première qui exploite ce système de culture *in vitro* pour étudier les effets de PE. Ce système présente comme avantages majeurs d'être un modèle poisson et d'isoler le tissu gonadique des régulations périphériques de l'organisme. Nous avons donc pu étudier les effets directs du clotrimazole sur le testicule. Ainsi, après exposition de ce tissu au clotrimazole et à d'autres azoles, les résultats montrent une inhibition de la synthèse et /ou de la libération de la 11-KT sans qu'il y ait d'effet sur l'expression des gènes cibles de la stéroïdogénèse. Nous avons donc pu émettre l'hypothèse d'une action sur une ou plusieurs activités enzymatiques CYP impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes. Ce système représente donc un nouvel outil, biologiquement plus pertinent que les lignées cellulaires mammaliennes dans notre cas.

## I.2. Les effets indirects du clotrimazole

Le niveau d'intégration le plus élevé dans le cadre de ce travail de thèse est l'organisme. Il a permis de mettre en évidence les effets indirects du clotrimazole et d'obtenir des éléments convainquants pour confirmer l'hypothèse d'une compensation biologique, contribuant ainsi à améliorer la caractérisation du mécanisme d'action du clotrimazole. Il a également permis d'étudier les effets du clotrimazole sur la spermatogénèse, en s'intéressant notamment aux relations entre marqueurs moléculaires de la spermatogénèse et effets adverses au niveau cellulaire et histologique. Ceci constitue un premier pas vers la recherche d'impacts sur la reproduction, fonction clef dans la dynamique d'une population.

### I.2.1. Mécanisme d'action

En préambule à ce paragraphe, une étude très récente chez le vairon à tête de boule, qui se propose de suivre les effets du kétoconazole au cours du temps, illustre l'hypothèse de la compensation biologique (Ankley et al., 2012). Dans ce cas, des poissons, mâles ou femelles ont été exposés *in vivo* au kétoconazole pendant 8 jours, suivis de 8 jours de dépuration. En parallèle, d'autres expositions de 8 jours ont été réalisées et les explants gonadiques ont été isolés à la fin de la période d'exposition pour 8 jours de dépuration. Dans ce cas, les résultats montrent que le kétoconazole inhibe la synthèse de stéroïdes sexuels, à savoir l'E<sub>2</sub> chez les femelles et la T chez les mâles, pendant l'exposition mais également pendant la période de récupération. En revanche, *in vivo*, les synthèses d'E<sub>2</sub> et de testostérone sont rapidement inhibées pendant l'exposition puis la diminution cesse avec la période de récupération, la concentration en testostérone retrouvant très rapidement un niveau de base chez les mâles et la concentration d'E<sub>2</sub> dépassant même le niveau de base chez les femelles.

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons montré que le clotrimazole induisait l'expression de gènes impliqués dans le processus de la stéroïdogénèse testiculaire *in vivo* selon un mécanisme d'action indirect impliquant l'axe hypophyse-gonade. En effet, une exposition à cette molécule, qui a la capacité d'inhiber la biosynthèse de stéroïde par une action directe *in vitro*, va conduire à une sur-expression de gènes par l'intermédiaire de la voie Fsh/FshR *in vivo*.

**Tableau 15** : Effets directs (*in vitro*) et indirects (*in vivo*) du clotrimazole sur l'expression de différents gènes dans le testicule et sur la concentration plasmatique en 11-KT

paramètres	Effet direct ( <i>in vitro</i> )	Effet indirect 7/21 jours (compensation <i>in vivo</i> )
<i>star</i>	=	↑
<i>hsd3b1</i>	non mesuré	=
<i>cyp17a1</i>	=	↑
<i>cyp11c1</i>	=	↑
gène <i>hsd11b3a</i>	=	= / ↑
<i>cyp19a1a</i>	=	= / ↑
<i>fshr</i>	non mesuré	↑
<i>lhr</i>	non mesuré	=
<i>igf3</i>	non mesuré	↑
<b>stéroïde 11-KT</b>	↓	= / ↑

= : pas d'effet ; ↑ : induction par rapport aux témoins, ↓ : diminution par rapport aux témoins

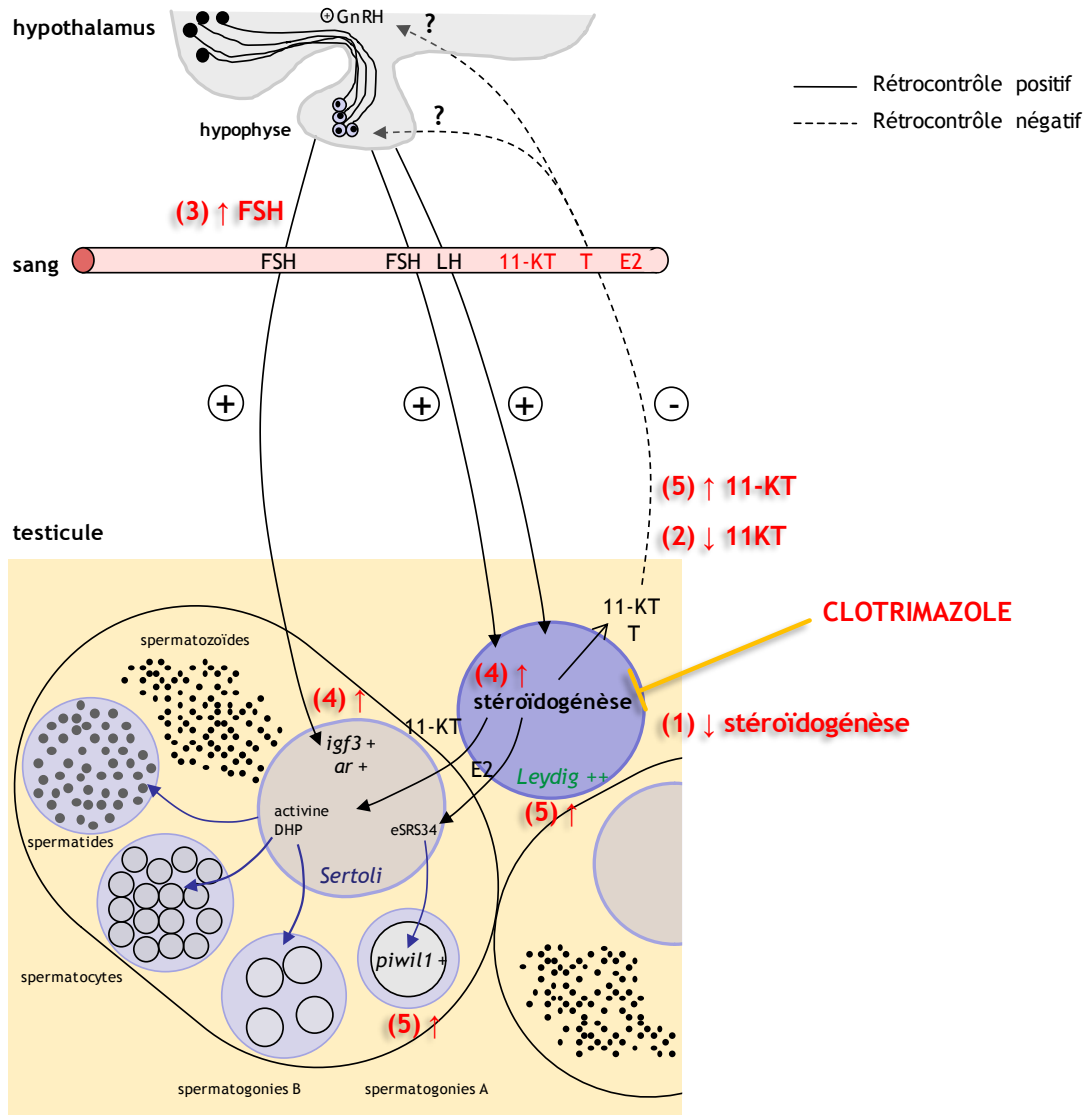
Le **tableau 15** illustre de manière synthétique les différences entre les résultats *in vivo* et *in vitro* de notre étude qui ont permis de poser l'hypothèse d'une compensation biologique, en accord avec d'autres auteurs (Ankley et al., 2007; Villeneuve et al., 2007b). Notre étude est par ailleurs la première qui met clairement en avant l'importance de la voie Fsh/FshR dans un tel mécanisme de compensation. D'autre part, nos travaux montrent l'intérêt des mesures réalisées au niveau de l'hypophyse, carrefour de la signalisation moléculaire le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade.

#### *1.2.2. Effets du clotrimazole sur la spermatogenèse*

Nous avons montré que le clotrimazole induisait la stéroïdogénèse selon un mécanisme d'action original passant par le système nerveux central. Même si la spermatogenèse semble globalement peu affectée au niveau des stades méiotiques et post-méiotiques, l'augmentation significative du nombre de spermatogonies A témoigne d'un impact du clotrimazole. De plus, cette augmentation du nombre de spermatogonies A s'accompagne d'une induction de l'expression de *piwil1*, un marqueur moléculaire spécifique des spermatogonies A. D'autres paramètres moléculaires ou tissulaires montrent des changements au niveau des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig. Tout d'abord, l'abondance des transcrits du gène *igf3*, un marqueur des cellules de Sertoli est augmentée chez les individus exposés au clotrimazole, comparativement aux individus témoins, tout comme l'abondance des transcrits du gène *ar*. Mais le résultat majeur de notre étude est l'augmentation de la proportion des cellules de Leydig dans l'espace interstitiel, qui s'accompagne également d'une augmentation du GSI. Ces événements observés à une échelle moléculaire et tissulaire amènent légitimement à se poser la question de l'impact du clotrimazole sur la reproduction.

### I.2.3. Bilan

Une représentation schématique du mécanisme d'action du clotrimazole *in vivo* le long de l'axe HPG chez le mâle est proposée dans la **figure 17**, en précisant l'ordre des événements et les effets physiologiques au niveau de la gonade.



**Figure 17** : représentation schématique du mécanisme d'action du clotrimazole *in vivo* chez le poisson zèbre adulte mâle

(1) action inhibitrice du clotrimazole sur les activités enzymatiques de la stéroïdogénèse (2) diminution transitoire de la concentration plasmatique en 11-KT (3) induction de la voie Fsh /FshR (4) Induction de la stéroïdogénèse (5) compensation ou sur-compensation, induction de la 11-KT plasmatique. *eSRS34* = “eel spermatogenesis related substance”, facteur de renouvellement des cellules souches spermatogoniales, *DHP* = 17a,20b-dihydroxy-4-pregnen-3-one.

Nous avons voulu inclure dans ce schéma le processus de la spermatogénèse pour avoir une vision d'ensemble des fonctions testiculaires. Nous avons également choisi de

mettre en évidence quelques facteurs, régulés par les stéroïdes sexuels, dont on connaît le rôle dans la progression de la spermatogenèse. Il a tout d'abord été démontré chez l'anguille que le facteur eSRS34 est un facteur de renouvellement des cellules souches spermatogoniales chez l'anguille (Miura et al., 2003; Miura et al., 2007). En effet, il est connu pour être induit par l'E<sub>2</sub> et un peptide recombinant, eSRS34, permet d'induire le renouvellement des cellules souches spermatogoniales dans un modèle de culture d'explant testiculaire. Deuxièmement, il a été démontré que la 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) avait un rôle dans la spermatogenèse puisqu'elle induit l'entrée en méiose des spermatogonies, et donc la prolifération des cellules germinales (Miura et al., 2007). L'activine joue quant à elle un rôle dans la prolifération spermatogoniale (Miura et al., 1995). Tous ces facteurs sont susceptibles d'être modulés suite à l'induction de la stéroïdogénèse médiée par la voie Fsh/FshR. Nous n'avons pas représenté le foie, qui, cependant, intervient dans le catabolisme hormonal, influant ainsi sur la concentration en 11-KT finale dans le sang. Par ailleurs, d'autres glandes que la gonade et le foie peuvent influencer la concentration en stéroïdes dans le sang (Fostier et al., 1983). Ces glandes peuvent participer directement à la production de stéroïdes sexuels, soit en produisant elle-même des stéroïdes, soit en sécrétant des précurseurs des stéroïdes pouvant être utilisés par la gonade. Ainsi, chez les poissons, il a par exemple été montré que la glande interrénale peut produire des précurseurs, comme la pregnenolone, pouvant être utilisés par la gonade (Idler and Truscott, 1972). Cette glande interrénale peut également synthétiser de la 11-KT à partir de l'androstérone, montrant ainsi sa capacité à produire des androgènes actifs (Idler and Macnab, 1967).

### I.3. Limites de la démarche expérimentale

Au regard du travail accompli, nous pensons que l'étude du mécanisme d'action aurait pu être approfondie.

Tout d'abord, en utilisant le modèle de culture d'explants testiculaires *in vitro*, il aurait pu être envisagé de mesurer (1) les différentes activités enzymatiques de la stéroïdogénèse par dosages radioimmunologiques (RIA) ou par ELISA dans le but de connaître précisément les cibles du clotrimazole chez le poisson zèbre. Dans le principe, le dosage radioimmunologique impliquerait l'introduction dans le milieu de culture de précurseurs des stéroïdes afin de suivre leur décroissance, ce qui permettrait d'analyser spécifiquement l'activité des différentes enzymes de la stéroïdogénèse. Cela inclut l'analyse de l'activité de la CYP51 14 $\alpha$ -

déméthylase, qui est la cible de nombreux azoles chez les champignons, mais également chez de nombreuses autres espèces, dont les mammifères (Zarn et al., 2003). Chez ces derniers, elle convertit le lanostérol en stérols activant la méiose (MAS). Ces MAS vont ensuite conduire à la synthèse du cholestérol, et peuvent moduler le développement des cellules germinales mâles et femelles (Byskov *et al.*, 1995; Stromstedt *et al.*, 1998). La réaction catalysée par le CYP51 14 $\alpha$ -déméthylase fait donc partie de la voie métabolique menant à la biosynthèse du cholestérol, considéré comme le précurseur de la stéroïdogénèse et donc des stéroïdes sexuels.

Ensuite (2) l'hypothèse de l'implication de la voie Fsh/FshR dans la médiation des effets du clotrimazole aurait pu être plus étayée. En effet, le rôle de cette voie peut, par exemple, être mis en évidence de manière indirecte en deux étapes. La première étape consisterait à exposer des poissons au clotrimazole *in vivo*. Ensuite, nous pourrions *in vitro* mettre des testicules de poissons non exposés au pesticide en présence d'extraits hypophysaires de poissons initialement exposés pour voir si la production de 11-KT est augmentée. De récents travaux ont montré que des systèmes de culture d'explants testiculaires de truite *in vitro* répondaient bien à des extraits hypophysaires en terme de biosynthèse de stéroïdes dans un contexte toxicologique (Marca Pereira et al., 2011). Ces travaux sont basés sur des études antérieures *in vitro* montrant un rôle de la Fsh et de la Lh dans la stimulation de la gamétogenèse sur des explants testiculaires d'anguille japonaise (Ohta et al., 2007) et des explants ovariens de truites (Rime et al., 2010), respectivement.

Plus simplement, des mesures directes de concentrations circulantes en Lh et Fsh seraient la manière la plus directe et efficace de mettre en évidence le rôle de cette voie. Il n'existe cependant pas à notre connaissance de dosages spécifiques de Lh et de Fsh chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Traditionnellement, les dosages immunologiques développés pour déterminer les niveaux de gonadotropines chez les poissons ont été les dosages radioimmunologiques (RIA) ou les ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assays »). Ces essais nécessitaient l'extraction et la purification des gonadotropines à partir des hypophyses naturelles de poissons. Pour les dosages immunologiques, la purification des gonadotropines est un processus très lourd, en terme de temps, de coût, mais également de matériel biologique (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). De plus, dans de nombreux cas, les purifications n'ont pas abouti, notamment pour la Fsh (Kamei *et al.*, 2003; Vischer *et al.*, 2003). Ainsi, depuis la fin des années 1980, les Fsh ont été caractérisées chez plusieurs espèces de poissons, mais des dosages immunologiques validés n'ont été développés que chez peu d'espèces, comme

quelques salmonidés (par exemple : (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1991; Govoroun *et al.*, 1998)).

Pour palier le développement de dosages immunologiques à partir de protéines natives, la caractérisation des ADNc codant pour les sous- unités  $\beta$  des gonadotropines permet de produire des protéines recombinantes. Elles sont alors utilisées comme antigènes pour générer des anticorps spécifiques afin de réaliser les dosages immunologiques. Dans le cas des gonadotropines (Gths), seulement la sous- unité  $\beta$  recombinante est nécessaire car c'est elle qui assure la spécificité, la sous- unité  $\alpha$ , commune aux deux Gths, ne permettant pas la génération d'anticorps spécifiques. Cette méthode semble être une bonne alternative puisque les protéines recombinantes peuvent être produites dans différents systèmes de manière continue et empêchent une contamination croisée avec d'autres glycoprotéines reliées aux Gths (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Ainsi, la disponibilité des sous- unités  $\beta$  chez le Tilapia a permis le développement d'un dosage immunologique validé. Plus récemment, une étude a rapporté que la production d'une protéine recombinante Fsh $\beta$  dans la levure a permis la génération d'anticorps spécifiques et le développement d'un ELISA permettant la quantification de Fsh dans le plasma et l'hypophyse chez le loup de mer (Moles *et al.*, 2005). Pour notre modèle d'étude, le poisson zèbre, des gonadotropines Lh et Fsh recombinantes ont été produites dans des cellules de mammifères, les Chinese Hamster Ovary (« CHO ») et ont montré des activités biologiques (Ge 2005). Cependant, aucun anticorps dirigés contre ces protéines recombinantes n'ont été développés.

Par ailleurs, il y a un manque d'information *in vivo* et *in vitro* sur les concentrations réelles de clotrimazole qui atteignent les tissus cibles. Par exemple, dans le système de culture *in vitro*, le clotrimazole doit transiter par un bloc d'agarose et une membrane de nitrocellulose avant d'atteindre le testicule. La proportion de clotrimazole qui atteint au final le tissu cible est donc inconnue. Par ailleurs, nous n'avons pas de données sur la métabolisation du clotrimazole *in vitro*, alors que nous savons par exemple que le testicule exprime des enzymes de métabolisation de phase I, comme le *cyp11a1* et le *cyp3a65* (Tseng *et al.*, 2005). Même si les concentrations initiales sont similaires, la comparaison entre les données *in vivo* et l'*in vitro* est donc délicate.

En ce qui concerne les niveaux d'expositions réels *in vivo*, des expérimentations préliminaires sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer la concentration de clotrimazole au niveau de l'organisme entier, après une étape de lyophilisation et d'extraction.



Il n'y a pas, à notre connaissance, d'étude organe-spécifique sur la concentration en azole fongicides chez les poissons. En revanche, des travaux récents chez le poisson zèbre exposé au tébuconazole 0,2 mg/L ont montré une bioconcentration de la molécule dans l'organisme entier, avec un facteur de bioconcentration de 38,80 L/Kg et une durée de 6 jours pour atteindre une concentration de tébuconazole maximale dans les tissus du poisson (Andreu-Sanchez *et al.*, 2010). Sachant que nos expositions de poissons zèbres *in vivo* ont duré entre 7 et 21 jours, cette étude est intéressante puisqu'elle montre une bioconcentration maximale d'un azole au bout de 6 jours.

Enfin, l'étude de la spermatogenèse aurait pu être plus approfondie, avec par exemple d'autres marqueurs cellulaires. Par exemple, un paramètre pertinent à mesurer serait l'expression d'*insl3* (Good-Avila *et al.*, 2009; Garcia-Lopez *et al.*, 2010), un marqueur des cellules de Leydig. En effet, la prolifération de ce type cellulaire interstitiel restant le résultat majeur obtenu au niveau de l'étude de la spermatogenèse, il serait intéressant de voir s'il est corrélé à l'expression de ce marqueur.

## II. Utilisation des connaissances pour une évaluation du risque

### II.1. Intérêts de l'étude dans une perspective d'évaluation des dangers et des risques des PE dans un cadre réglementaire

Le clotrimazole agit comme une molécule « anti-androgénique » pour sa capacité à inhiber la synthèse d'androgène *in vitro*, et indirectement comme une molécule « androgénique », dans le sens où elle active la synthèse d'androgène *in vivo* suite à l'activation de la voie Fsh/Fshr. Ainsi, les effets observés *in vivo* ne sont donc pas le reflet des effets observés *in vitro*. Les 2 modèles apportent donc des informations différentes, l'un permettant de déterminer le potentiel d'une molécule à inhiber la biosynthèse hormonale (*in vitro*) et l'autre intégrant l'ensemble des processus biologiques lié à la synthèse hormonale et au catabolisme (*in vivo*). Il semble donc pertinent d'utiliser les deux dans une approche visant à déterminer les dangers et les risques sur les organismes liés aux PE.

Pour évaluer les effets des PE, il existe des méthodes de référence décrites dans des textes réglementaires internationaux rédigés par l'OCDE et réactualisés au cours du temps.

Ainsi, concernant l'évaluation des dangers et des risques des PE sur la stéroïdogénèse, il existe la ligne directrice 456. Ce texte décrit un test *in vitro* validé permettant d'effectuer un criblage de molécules sur des lignées cellulaires de carcinome surrénalien humain H295R exposées pendant 48h à 7 doses croissantes des dites molécules. Des mesures de concentrations en stéroïdes, à savoir T et E<sub>2</sub>, sont ensuite réalisées pour déterminer le potentiel de perturbation endocrinienne de la molécule. L'évaluation des effets potentiels des substances chimiques sur la stéroïdogénèse se base uniquement sur une lignée mammifère. A ce jour, il n'existe donc pas de modèles poissons pour évaluer les effets des substances sur la biosynthèse hormonale dans les tissus gonadiques. Chez les mammifères, la régulation des gènes est tissu-spécifique. Par conséquent, la lignée H295R ne reflète les effets que dans un contexte cellulaire bien spécifique. Chez les poissons, il n'existe pas de lignées cellulaires stéroïdogènes, quel que soit le tissu cible considéré. La culture d'explants de testicule constitue donc la seule alternative si l'on souhaite obtenir des informations qui soient spécifiques des poissons. Des modèles similaires ont été développés chez la truite, aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Monod et al., 1993 ; Rime et al., 2010 ; Marca Pereira et al., 2011). Il semble donc que ce type d'approche puisse être étendu à différentes espèces, ce qui représente un avantage certain dans le contexte écotoxicologique. Pour autant, en raison de la relative complexité de mise en œuvre de ces essais, il semble difficile d'envisager ce type de test à l'OCDE comme bio-essai de criblage de l'activité PE des substances chimiques.

Concernant les expérimentations *in vivo*, deux lignes directrices, 229 et 230, ont été validées au sein de l'OCDE pour tester les produits chimiques. Ces essais impliquent l'exposition simultanée de poissons mâles et de femelles pendant 21 jours et ils sont principalement centrés sur les effets de composés interagissant avec les récepteurs gonadiques aux stéroïdes, notamment les récepteurs ER et AR.

- Tout d'abord, la *ligne 229*, appelée *test de reproduction des poissons à court terme*, a été validée chez le vairon à tête de boule, et dans une moindre mesure chez le medaka japonais et le poisson zèbre. Brièvement, des poissons sont exposés à trois concentrations croissantes d'un composé chimique. Deux critères sont mesurés à la fin de l'exposition : la vitellogénine, chez les trois espèces, et les caractères sexuels secondaires, chez le vairon à tête de boule et le medaka uniquement. La fécondité est également évaluée tous les jours et les gonades sont prélevées pour une analyse histopathologique.

- La ligne 230 décrit un test qui a été pensé pour réaliser des criblages de composés chimiques afin d'évaluer leurs effets sur les activités œstrogéniques et androgéniques ainsi que sur l'inhibition de l'activité aromatase. Il est donc sensiblement différent de la ligne 229 dans sa finalité, même si les mêmes espèces sont utilisées ainsi que des critères communs, comme les caractères sexuels secondaires et la mesure de la fécondité.

Ces deux tests sont peu adaptés pour renseigner des effets indépendants des récepteurs aux œstrogènes ou aux androgènes, et seule la mesure de l'activité aromatase semble pertinente pour étudier les effets des azoles.

Dans ce contexte, la démarche expérimentale mise en œuvre au cours de notre étude présente un intérêt. Ainsi, la mesure de paramètres *in vivo* dans le sang et les testicules s'avèrerait pertinente.

(1) Les testicules pourraient être séparés en deux, avec d'un côté un testicule destiné aux mesures d'expression de gènes, et d'un autre côté, un testicule destiné à une analyse morphométrique. Une étude récente a en effet montré qu'il n'y avait pas de différences apparentes en terme de composition en cellules germinales entre le testicule droit et le testicule contra-latéral (Leal et al., 2009). Les mêmes auteurs ont montré qu'il n'y avait pas non plus de différences en termes de marqueurs moléculaires des cellules somatiques et des cellules germinales. Ainsi, les testicules peuvent être séparés en deux pour réaliser des mesures différentes. Il s'agirait de mesurer les variations des transcrits des gènes intervenant dans le processus de la stéroïdogénèse, comme *star*, *cyp17a1*, *cyp11c1* et *cyp19a1* ainsi que les récepteurs aux gonadotropines, *fshr* et *lhr*. Pour le testicule contra-latéral, une analyse morphométrique permettrait de rechercher un impact sur la gamétogenèse. Pour les mesures d'expression de gènes, on peut également imaginer que le développement d'une puce dédiée, basé sur les gènes sélectionnés au niveau de l'étude mais également étendu à d'autres gènes le long de l'axe HPG, serait intéressant en terme de gain de temps.

(2) Dans le sang, nous avons mis en évidence que la mesure de 11-KT est possible. Elle peut en outre aisément se combiner aux mesures de vitellogénine circulante par ELISA comme préconisé dans les lignes directrice 229 et 230. Dans notre travail, nous avons mis en avant l'importance de la voie Fsh/FshR dans la médiation des effets du clotrimazole. La mesure de paramètres hypophysaires semble donc intéressante du point de vue mécanistique, mais en

raison de du temps de prélèvement de l'hypophyse, de la faible quantité d'ARN totaux, il semble difficile d'intégrer ces paramètres en routine. Au contraire, les mesures plasmatiques des concentrations en gonadotropines circulantes pourraient être d'intérêt. Cependant, aucun dosage spécifique n'est disponible chez le poisson zèbre. Des développements méthodologiques sont donc nécessaires. Indépendamment de ces aspects, il convient aussi de considérer que les volumes sanguins chez le poisson zèbre sont faibles et l'on ne peut certainement pas multiplier le nombre de paramètres sanguins à mesurer.

## II.2. Vers une approche intégrée et une modélisation des critères d'évaluation de la perturbation

Un des moyens d'exploiter la démarche expérimentale mise en œuvre et les données biologiques acquises est de les intégrer dans un modèle, graphique ou mathématique.

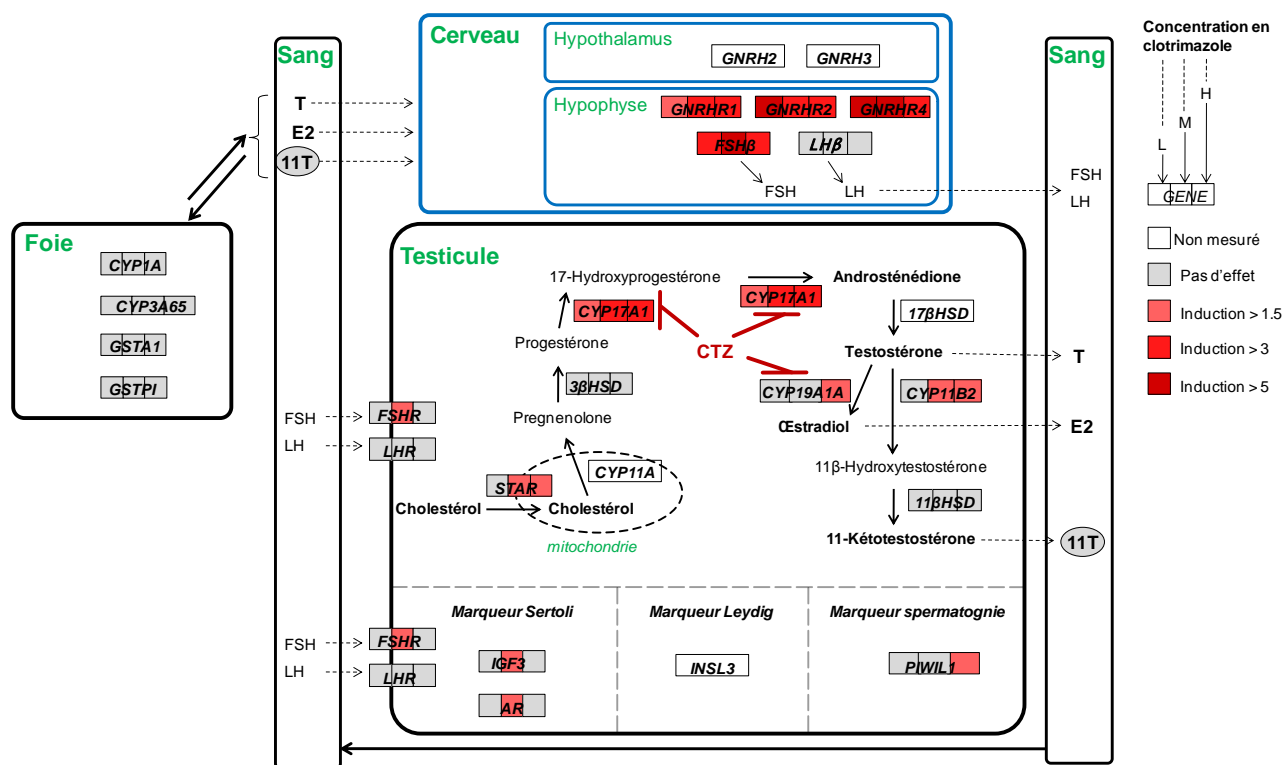
Dans le cadre de l'étude des effets de perturbateurs endocriniens chez le poisson, des travaux très récents ont eu pour but de développer (i) des modèles graphiques et (ii) mathématiques en se basant sur des paramètres biologiques impliqués directement ou indirectement dans l'axe cerveau-hypophyse-gonade. Ces modèles ont pour objectif final d'améliorer la compréhension des systèmes biologiques étudiés ainsi que la capacité à prédire les risques associés à l'exposition à des produits chimiques. Ce ne sont pas les seuls modèles qui existent pour l'étude des perturbateurs endocriniens mais ce sont, à notre connaissance, les plus pertinents en termes de perspectives dans le cadre de ce travail de thèse.

(i) Tout d'abord, un modèle graphique a été proposé afin de faciliter la recherche en écotoxicogénomique et afin de venir en appui à l'interprétation mécanistique de résultats obtenus après exposition à des PE (Villeneuve *et al.*, 2007d). Ce modèle schématise l'axe cerveau-hypophyse-gonade du vairon à tête de boule, qui est représenté par 6 compartiments anatomiques symbolisant les organes majeurs impliqués dans l'axe BPG, à savoir le cerveau, l'hypophyse, la gonade (testicule ou ovaire), le foie et le sang. Au sein de ces compartiments, ou entre plusieurs compartiments, sont intégrées les interactions entre des protéines, de simples molécules, la régulation transcriptionnelle de gènes. Au total, sont représentés dans ce modèle à peu près 300 réactions ou processus différents. Il est important de noter que ce modèle est construit sur la base d'hypothèses en ce qui concerne les interactions entre les différents paramètres sélectionnés. Même si ces hypothèses s'appuient en grande partie sur la

littérature, c'est un fait à prendre en considération. Pour une molécule testée, des hypothèses sont donc posées, à partir des effets, directs ou indirects, que l'on connaît de cette molécule, et une prédiction est faite sur l'influence de la molécule le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade. Ensuite les paramètres mesurés sont confrontés au modèle de départ. Par exemple, le modèle a été appliqué dans le cadre de l'étude des effets du fadrozole, qui est un inhibiteur d'aromatase, sur le vairon à tête de boule femelle (Villeneuve et al., 2007d). Les variations de niveaux de transcrits de gènes ont été déterminées chez des individus exposés au fadrozole par rapport aux niveaux observés chez des témoins. Les résultats montrent que globalement, les hypothèses de départ ont été confirmées. Cependant, les mesures d'expression de gènes mesurées dans l'ovaire ne vont pas toutes dans le sens d'une compensation biologique, alors que c'était l'hypothèse de départ. Cela montre donc une des limites de ce modèle, qui reste tout de même très pertinent dans son ensemble.

(ii) De la même manière que le modèle graphique présenté ci-dessus, un modèle intégratif de l'axe cerveau-hypophyse-gonade a été développé chez le vairon à tête de boule, tout d'abord chez le mâle (Watanabe *et al.*, 2009), puis chez la femelle (Li *et al.*, 2011). Ce modèle s'appuie sur la physiologie du vairon à tête de boule pour simuler comment des molécules modèles, comme les œstrogènes ou les androgènes, peuvent influencer des paramètres clefs de la reproduction, comme les concentrations en stéroïdes sexuels ou en vitellogénine dans le plasma. Par rapport au modèle graphique, il y a une prise en compte de plusieurs constantes, notamment pharmacocinétiques pour chaque paramètre (par exemple, la constante de dissociation d'une enzyme). En revanche, le modèle prend en compte un nombre plus restreint de paramètres. Concernant les résultats, si l'on prend l'exemple de la femelle, des simulations de Monte Carlo (chaines de Markov) calibrés pour 26 paramètres chez des individus non exposés, exposés au œstrogènes ou aux androgènes, montrent qu'il y a une bonne correspondance entre le model prédictif et les données expérimentales.

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons fait une synthèse des données sous la forme d'un schéma qui représente les différents compartiments ou organes par des boites qui renfermeraient les différents paramètres mesurés, un peu à la manière du modèle graphique développé par (Villeneuve et al., 2007d). Ces différents paramètres seraient inhibés, inchangés ou induits en fonction de l'exposition ou non au clotrimazole. Des flèches indiqueraient les liens entre les différents paramètres au sein d'un même compartiment ou bien entre des paramètres de deux compartiments différents. Ce schéma, s'inspirant également des travaux de Zhang *et al.*, 2008 et Liu *et al.*, 2011, est représenté dans la **figure 18** ci-après :



**Figure 18** : Représentation graphique des effets du clotrimazole (CTZ, 3 concentrations : L = *low* 71  $\mu g/L$  ; M = *medium* 159  $\mu g/L$  ; H = *high* 258  $\mu g/L$ ) sur l'expression de gènes dans 4 compartiments (organes) : le cerveau, le foie, le testicule et le sang après 7 jours d'exposition.

Notre représentation reste assez simple et intègre des hypothèses de départ, comme l'action inhibitrice directe du clotrimazole (CTZ) sur les activités des enzymes de la stéroïdogénèse. Les facteurs d'induction des gènes sont directement représentés par un code couleur. Les hypothèses de départ ne sont d'ailleurs pas toujours vérifiées expérimentalement. Par exemple, on pouvait s'attendre à ce que les effets indirects du clotrimazole, à savoir la compensation biologique, passe par une induction de l'expression du *gnrh3*. Pour améliorer ce schéma, il peut être envisagé de reprendre plus en profondeur le modèle graphique de (Villeneuve et al., 2007d). On peut également penser que des mesures plus globales des effets génomiques du clotrimazole, par exemple par puce à oligonucléotides, permettrait de sélectionner de nouveaux paramètres clefs de ce réseau. Cette représentation schématique reste cependant un premier pas vers la création d'un modèle de type prédictif. Même si cette version reste imparfaite, puisqu'elle prend par exemple en compte un nombre limité de paramètres et qu'elle n'est pas dynamique dans le temps, elle a l'avantage de montrer un enchainement d'évènements logiques entre différents « compartiments » le long de l'axe reproducteur suite à une contamination à un composé chimique.

# **Conclusions et perspectives**

Les PE sont des composés chimiques aux modes d'action complexes pouvant agir de manière variée sur la fonction endocrine. Leur présence dans le milieu aquatique a soulevé de nombreuses interrogations concernant leurs effets sur les organismes aquatiques. Il y a donc une nécessité de développer des outils permettant d'évaluer les dangers et les risques de ces composés sur la fonction de reproduction des organismes aquatiques. Les recherches menées sur les PE ont pour but d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'action de ces composés mais aussi de détecter de manière précoce des altérations potentielles de la fonction de reproduction. Cependant, la plupart des études menées jusqu'à présent se sont focalisées sur des molécules agissant par interaction avec des récepteurs nucléaires, en particulier les récepteurs hormonaux, alors que comme mentionné ci-dessus, les mécanismes d'action des PE se révèlent être très variés. Ils peuvent agir sur le processus de la stéroïdogénèse.

Dans ce contexte, cette thèse a visé à apporter des informations nouvelles sur le mécanisme d'action d'un fongicide azolé, le clotrimazole, qui est connu pour inhiber des activités enzymatiques cytochromes P450. Pour commencer, nous avons focalisé nos efforts sur ses effets au niveau de la stéroïdogénèse testiculaire en nous appuyant sur l'étude d'un réseau de gènes fonctionnels le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade, ce qui a nous permis d'examiner son mécanisme d'action. Nous avons également cherché à déterminer son impact sur la spermatogénèse, afin d'explorer ses effets sur la fonction de reproduction.

Ce travail, structuré autour d'axes complémentaires, nous a permis d'obtenir des résultats significatifs par rapport à la problématique posée. De manière générale, il a permis de :

- (i) Développer de nouveaux outils permettant d'étudier les effets de composés chimiques sur la stéroïdogénèse. Nous avons notamment montré l'intérêt du modèle d'explant testiculaire à répondre à des fongicides azolés, mais aussi à des composés modèles, en termes de synthèse de stéroïde.
- (ii) Développer une démarche expérimentale intégrative permettant d'étudier l'effet de PE sur la stéroïdogénèse. Cette démarche montre la complémentarité des approches *in vitro* et *in vivo* dans le cas de l'étude de PE. Elle montre également l'intérêt d'examiner les niveaux de transcrits d'un ensemble de gènes le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade ;



Plus précisément, ce travail a permis de :

- (iii) Montrer une perturbation de la stéroïdogénèse testiculaire après une exposition au clotrimazole. Tout d'abord, nous avons mis en évidence une action directe du clotrimazole sur la synthèse et/ou la libération de 11-KT dans les testicules à l'aide d'un modèle d'explants testiculaires de poisson zèbre. Ensuite, nous avons montré que les effets *in vivo* étaient différents, avec une induction du niveau des transcrits de gènes intervenant dans le processus de la stéroïdogénèse, suggérant un effet indirect du clotrimazole.
- (iv) Caractériser le mode d'action du clotrimazole *in vivo* chez le mâle en montrant que l'induction indirecte de la stéroïdogénèse au sein du tissu testiculaire (induction de l'expression des gènes, induction de la synthèse de stéroïde circulant) passe par l'activation de la voie Fsh/FshR au niveau hypophysaire et gonadique. Ces résultats significatifs viennent appuyer l'hypothèse de la compensation biologique proposée par d'autres auteurs (Ankley et al., 2007; Villeneuve et al., 2007b; Zhang et al., 2008a).
- (v) Constater un effet du clotrimazole sur la spermatogénèse, avec une augmentation du GSI, du nombre de cellules de Leydig et de l'expression de marqueurs spécifiques de différents types cellulaires au niveau de la spermatogénèse.

Dans l'ensemble, les objectifs fixés en début de thèse ont été atteints, avec notamment une avancée significative dans la compréhension des mécanismes d'action du clotrimazole, et la mise en avant d'une démarche expérimentale pertinente dans le cadre de l'étude de composés à activité de perturbateur endocrinien.

Ces travaux ouvrent par ailleurs de nombreuses perspectives. Tout d'abord, comme énoncé en fin de discussion, une réflexion doit être menée sur l'apport de la démarche expérimentale mise en place et d'un outil comme la culture d'explant testiculaire chez le poisson dans un contexte réglementaire. Cette réflexion inclut également le développement d'un modèle graphique qui doit être complété par d'autres paramètres clefs de l'axe HPG, en réalisant par exemple un vaste screening de l'expression différentielle de gènes par puce à oligonucléotides. De la même manière qu'une analyse avec une puce à oligonucléotides, il pourrait être envisagé une analyse de type métabolomique par spectrométrie de masse pour

une étude plus systématique des stéroïdes, afin de donner plus d'informations sur la perturbation des voies de synthèse. Nous avons évoqué dans la discussion la mesure des gonadotropines circulantes, mais il peut également être envisagé de mesurer d'autres paramètres, comme ceux impliqués dans les rétrocontrôles gonades-cerveau, par exemple l'activine ou l'inhibine.

Deuxièmement, au vu des effets observés chez les mâles, nous pouvons légitimement nous poser la question des effets de cette substance chez les femelles (i) peut-on transposer la démarche utilisée des individus mâles vers les individus femelles, de l'étude du réseau de gènes le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade à la morphométrie gonadique? (ii) existe-t-il des marqueurs moléculaires pertinents des différents types cellulaires ovariens pour les cellules somatiques et germinales? (iii) Quels sont les effets histologiques et les conséquences sur la reproduction?

Dans le but d'apporter des premiers éléments de réponse à ces questions, nous avons récemment exposé des mâles et des femelles au clotrimazole (1,5 – 100 µg/L) pendant 21 jours dans un système de contamination continue, après une période sans exposition de 7 jours. Dans chaque aquarium, 2 mâles ont été associés à une femelle. Les pontes ont ensuite été relevées quotidiennement pendant la période de stabulation et la période d'exposition. La qualité des œufs a été évaluée en mesurant le diamètre du chorion et du vitellus, et le taux d'éclosion a été quantifié. Les premiers résultats ont montré une altération de la qualité des œufs pour la plus forte concentration accompagnée d'une réduction de leur taille. En parallèle, des mesures biochimiques ont permis de constater une diminution de la Vtg plasmatique chez les femelles. Ensuite, une diminution marquée et dépendante de la concentration du clotrimazole, du nombre de pontes a été observée. Cette étude est en accord avec d'autres travaux montrant une diminution des pontes chez des poissons exposés au kétoconazole, au prochloraz, ou encore au fadrozole (Ankley et al., 2002; Zhang et al., 2008a). Ces premiers résultats restent à confirmer et soulèvent des questions quand aux mécanismes moléculaires sous-jacents chez la femelle.

Enfin, on peut se poser la question des effets de co-expositions de plusieurs azoles. En effet, il est intéressant de remarquer que lorsque des mesures sont réalisées en milieu aquatique, plusieurs azoles sont retrouvés dans un même échantillon, pouvant aller jusqu'à 10 ou 15 molécules différentes. La question des effets de mélange est donc pertinente, car malgré quelques études *in vitro* (par exemple : Sanderson et al., 2002), il y a un manque d'informations *in vivo* portant sur cette thématique. Y a-t-il une synergie, ou une compétition

entre les azoles pour les sites catalytiques des enzymes de la stéroïdogénèse? Quel sont les effets de mélanges d'azoles sur la compensation biologique *in vivo* ? Enfin, les concentrations utilisées dans notre étude étant relativement élevées, il serait intéressant d'évaluer les effets d'azoles à des concentrations plus proches d'une réalité environnementale, en augmentant cependant les durées d'exposition.

# **ANNEXE 1**

# Characterization of the mode of action of the pharmaceutical clotrimazole on testicular steroidogenesis in zebrafish

Baudiffier Damien<sup>1</sup>, Hinfray Nathalie<sup>1</sup>, Vosges Mélanie<sup>1</sup>, Porcher Jean- Marc<sup>1</sup>, Schulz Rüdiger<sup>2</sup>, Brion François<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> INERIS, Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Verneuil-en-Halatte, FRANCE; <sup>2</sup> University of Utrecht, The Netherlands  
francois.brion@ineris.fr

## Background and Objectives

Clotrimazole is an azole fungicide used as pharmaceutical that has been recently measured in aquatic environment [1]. This substance is known to inhibit CYP enzymatic activities, including several steroidogenic CYP as evidenced by mammalian and fish *in vitro* assays [2,3] but little is known about its endocrine disrupting potency in fish. In vertebrates, gonadal steroidogenesis is under the control of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. Pituitary luteinizing hormone (LH) and folliculo-stimulating hormone (FSH) regulate steroidogenesis and gametogenesis through interaction with their gonadal receptors. In turn, steroid hormones induce feedback on neuro-endocrine circuits, influencing the reproductive axis. The aim of the present study was (i) to assess the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis by conducting *in vivo* experiments and (ii) to characterize its mode of action by studying a network of functional target genes of the pituitary-gonad axis.

## Materials and Methods

**- Animals:** adult zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) come from our breeding unit

**- Molecule studied:**

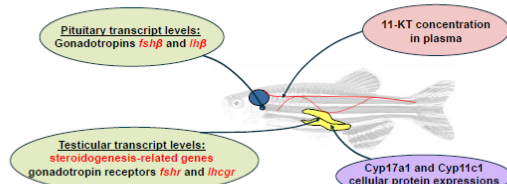


Figure 1: structure of clotrimazole

**- Chemistry:** clotrimazole concentration in the water was determined by Solid Phase Extraction followed by HPLC UV-Vis [4]

## - Experimental design and measurements

**In vivo:** 7 days exposure (clotrimazole: 71, 159, 258 µg/L) in 4L tanks (semi-static conditions, total renewal of the water every day)



**- Genes expressions quantifications** were performed by real time PCR.

**- Immunohistochemistry** was performed using specific Cyp17a1 and Cyp11c1 antibodies.

**- 11 ketotestosterone (11-KT) measurement** was realized by a competitive ELISA (Cayman, 11-KT EIA Kit).

**- Data analysis:** *in vivo*: a parametric ANOVA or a non-parametric Kruskal-Wallis test was used. Data are represented as Mean ± SEM. SC: Solvent Control. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. SC.

## Results

### 1/ Clotrimazole induces steroidogenesis-related genes and proteins expressions *in vivo*

#### 1.1. Clotrimazole increases steroidogenesis-related genes expressions

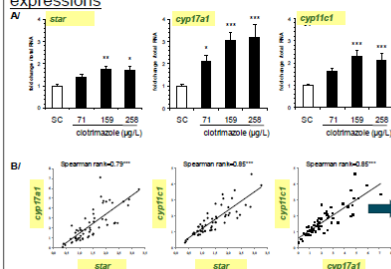


Figure 2: *In vivo* effect of clotrimazole on (A) key steroidogenic-related genes expressions (n = 12-19 fish /condition) and (B) correlation between transcript levels in testis (N = 62-68)

#### 1.2. Clotrimazole induces Cyp17a1 and Cyp11c1 protein synthesis in Leydig cells but does not affect 11-KT concentration

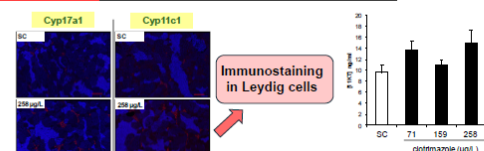


Figure 3: Cyp17a1 and Cyp11c1 immunolabelling following a 7 days exposure to clotrimazole (N = 4-5 fish /condition). Blue = Hoechst (nuclear marker), red = CYP labelling, bars = 50 µm

Figure 4: *In vivo* effect of clotrimazole on circulating 11-KT concentration (n = 16-20 fish /condition)

### 2/ Clotrimazole-induced steroidogenesis *in vivo* is likely mediated by FSH/FSHR signaling

#### 2.1. Clotrimazole increases transcript levels of pituitary *fshβ* and its testicular receptor *fshr*

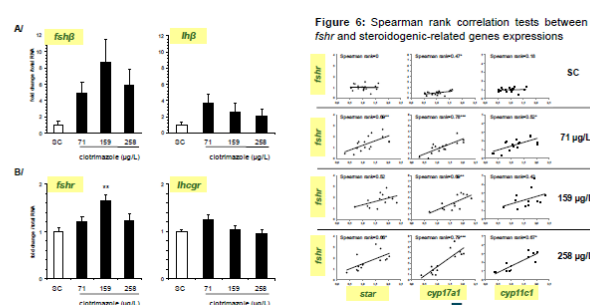
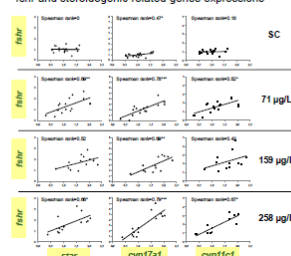


Figure 5: *In vivo* effect of clotrimazole on (A) pituitary gonadotropin β sub-units and (B) testicular receptors genes expressions (n = 10-19 fish /condition) following a 7 days exposure.

Figure 6: Spearman rank correlation tests between *fshr* and steroidogenic-related genes expressions



Correlation between *fshr* and expression of steroidogenic related-genes in clotrimazole-exposed groups

#### 2.2. Clotrimazole induces insulin-like growth factor 3 (*igf3*) expression, a gene expressed in Sertoli cells and regulated by Fsh

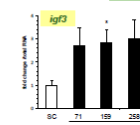


Figure 7: *In vivo* effect of clotrimazole on Sertoli cell marker *igf3* gene expression (n = 12-19 fish /condition) following a 7 days exposure.

Induction of *fshβ*, *fshr*, correlation between *fshr* and steroidogenesis-related genes expressions and *igf3* induction indicated that Fsh is likely involved in clotrimazole-induced changes in testicular physiology

## Conclusions /Perspectives

By studying a functional network of genes along the pituitary-gonad axis, we show that clotrimazole induces a cascade of molecular and cellular events at the pituitary and testicular level that is compatible with assuming an important role for Fsh (1) in stimulating Leydig cell steroidogenesis to compensate the inhibitory action of clotrimazole on 11-KT synthesis and (2) in inducing the expression of the Fsh-regulated *igf3* gene in Sertoli cells. Studying this gene network along the pituitary-gonad axis appears useful and relevant to investigate further the mode of action of clotrimazole and it demonstrates that this chemical triggered compensatory response of the HPG axis. The disruption of testicular steroidogenesis raises further concerns about the impact of clotrimazole on reproduction.

## References

- [1] Kallie et al., Environmental Science and Technology, 2008  
[2] Hinfray et al., Comparative Biochemistry and Physiology, 2008  
[3] Vinggaard et al., Toxicology in Vitro, 2000  
[4] Peschka et al., Analytic Bioanalytic Chemistry, 2007

## Acknowledgment



# **ANNEXE 2**

**Cyp17 and Cyp19a1 enzymes localization in the adult zebrafish (*Danio rerio*) testis is differentially affected by estradiol**

Hinfray Nathalie<sup>1\*</sup>, Nóbrega Rafael Henrique<sup>2,3</sup>, Caulier Morgane<sup>1</sup>, Baudiffier Damien<sup>1</sup>, Maillot-Maréchal Emmanuelle<sup>1</sup>, Chadili Edith<sup>1</sup>, Palluel Olivier<sup>1</sup>, Porcher Jean-Marc<sup>1</sup>, Schulz Rüdiger<sup>2</sup>, Brion François<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>2</sup> University of Utrecht, Science Faculty, Department Biology, Division Developmental Biology, Reproductive Biology Group, Kruyt Bldg Room W-606, Padualaan 8, NL-3584 CH Utrecht, Netherlands

<sup>3</sup> São Paulo State University, Bioscience Institute, Department of Morphology, Rubiao Jr s/n, CEP 18618-000, Botucatu, São Paulo – Brazil

Corresponding author:

Dr Hinfray Nathalie

INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

Phone : +33-3 44 55 69 69

Fax : +33-3 44 55 66 05

Email : [nathalie.hinfray@ineris.fr](mailto:nathalie.hinfray@ineris.fr)



## 1. Introduction

Steroid hormones are key regulators of growth, development and reproduction in vertebrates. Sex steroid hormones are mainly produced in the gonads and their plasma concentrations change greatly during the process of gonad maturation. In fish, testis tissue produces all three major types of sex steroid hormones, progestagens, androgens, and estrogens, each having distinct functions in the regulation of spermatogenesis, from spermatogonial stem cell self-renewal to sperm maturation, while exerting regulatory effects either directly on the testis, or indirectly via feedback effects on the brain and/or pituitary (Schulz et al., 2010). However, androgens clearly are the quantitatively dominating steroid product of the testis (Schulz et al., 2010).

The synthesis of steroid hormones from a common precursor, cholesterol, is supported by numerous enzymes including several P450 cytochromes (Baroiller et al., 1999). Among these P450 cytochromes, the 17- $\alpha$ -hydroxylase, 17, 20 lyase (Cyp17) catalyzes the hydroxylation of pregnenolone to 17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone or of progesterone to 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone, and the cleavage of the C17,20 bond to convert 17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone and 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone to dehydroepiandrosterone and androstenedione, respectively. An *in silico* study search revealed the existence of two cyp17 genes (cyp17a1 and cyp17a2) in the zebrafish genome (Zhou et al., 2007). Aromatases (Aromatase A (Cyp19a1a) encoded by the cyp19a1a gene and aromatase B (Cyp19a1b) encoded by the cyp19a1b gene) catalyze the conversion of androgens into estrogens. Similar to mammals, both, Cyp17 and Cyp19a1 proteins are strongly expressed in the Leydig cells of the testes of several species of fish (Dalla Valle et al., 2002; Halm et al., 2003; Yu et al., 2003; Blazquez and Piferrer, 2004; Wang and Orban, 2007; Hinfray et al., 2011) including zebrafish (*Danio rerio*) (De Waal et al., 2009; Hinfray et al., 2011). Initially, Cyp17 was thought to be confined to classic steroidogenic tissue but mRNA, protein and activity for this enzyme were also detected in other tissues, such as brain (Hojo et al., 2004), liver (Katagiri et al., 1998) and stomach, duodenum and kidney for rodents (Dalla et al., 2002). A wide distribution of this enzyme in different tissues also in other species, like zebrafish, has been demonstrated (Wang and Ge, 2004). Recently, studies in mice detected Cyp17 in germ cells; spermatogonia, pachytene spermatocytes, spermatids and sperm (Qiang et al., 2003; Liu et al., 2005), and the loss of this enzyme is associated with sperm abnormalities and infertility (Liu et al., 2005). This suggests that in addition to steroidogenesis, Cyp17 has a role in sperm

structure and function (Liu et al., 2005). Cyp19 (P450 aromatase) has also been found in a wide variety of tissues in addition to gonads: placenta, bone, adipose tissue, blood vessels, skin, endometrium and brain (see review in Chumsri et al., 2011). In the different mammalian species studied so far, P450 aromatase expression has been detected in several testicular somatic cells (e.g., Leydig cells) as well as in gonocytes, spermatogonia, spermatocytes (preleptotene/pachytene), spermatids and spermatozoa (see review in Chumsri et al., 2011). However, there is little information available in fish with respect to the question if other testicular cell types express these enzymes as well (Carreau et al., 2011).

Testicular steroidogenesis is very sensitive to exogenous steroids. Effects following in vivo exposure of African catfish to testosterone include a loss of the 17,20 lyase but not of the 17-alpha-hydroxylase activity, and a reduction to 50% of the number of mitochondria and of the cytoplasmic area in Leydig cells (Cavaco et al., 1999; Schulz et al., 2008). In adult zebrafish, exposure to estradiol in vivo led to an interruption of spermatogenesis following a down-regulation of testicular androgen synthesis, presumably via feedback inhibition of gonadotropin release (De Waal et al., 2009). Several other studies have also documented the inhibitory effect of estrogens on the testicular expression of steroidogenic enzymes such as cyp17, P450 side chain cleavage, 11-beta-hydroxylase in fish (Govoroun et al., 2001; Baron et al., 2005; Filby et al., 2006; Brion et al., 2008; De Waal et al., 2009) which could explain the deleterious effects of these compounds on fish reproduction (Brion et al., 2004).

In this context, the aim of this study was first to localize the cellular sites of synthesis of key steroidogenic enzymes (Cyp17, aromatase A and aromatase B) involved in the production of androgens and estrogens in zebrafish testis, paying attention also to other cell types than Leydig cells. Enzyme protein localization was studied immunohistochemically, using specific antibodies against zebrafish Cyp17a1, Cyp19a1a and Cyp19a1b. Furthermore, we have evaluated the effect of oestrogen treatment on the localization of these enzymes in order to study how deregulation of their synthesis is linked to 17-beta-estradiol-disrupted spermatogenesis. The major outcomes of this study are that Leydig cells express Cyp17a1 and Cyp19a1a, while testicular germ cells express Cyp17a1 and both, Cyp19a1a and Cyp19a1b. Moreover, 17-beta-estradiol exposure specifically affects only Leydig cell Cyp17a1 synthesis, preceding the disruption of spermatogenesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Zebrafish maintenance

Adult wild type zebrafish (AB strain) were bred in a laboratory facility at INERIS (France). They were maintained in 3.5 L aquaria in a recirculation system (Zebtec, Tecniplast, France) on a 14:10 light:dark cycle at a temperature of  $25.1 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Zebrafish exposure

Adult male zebrafish were exposed to 10 nM of 17-beta-estradiol (E2) or to solvent alone (dimethylsulfoxide (DMSO), 0.00001%) during 7 and 14 days. Fish were exposed under semi-static conditions in 4 L tanks with 100% water renewal every day (temperature:  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; pH:  $8.2 \pm 0.2$ ; dissolved oxygen:  $6.4 \pm 0.2$  mg/L; conductivity:  $269 \pm 37$   $\mu\text{S/cm}$ ). Exposure was performed in one tank per condition, each containing 6 male fish. At the end of exposure, zebrafish were euthanized in ice-cold water, weighed and measured. Testes were removed and weighed to determine the gonadosomatic index ( $\text{GSI} = \text{testis wet weight} / \text{total fish wet weight} \times 100$ ).

### 2.3. cyp17a1 and cyp19a1 mRNA in sorted testicular cell fractions

To generate data on the cellular localization of testicular cyp17a1 and cyp19a1 expression with an independent approach, we used testes from *vasa::egfp* zebrafish (Krovel and Olsen, 2002) as tissue donors. Testis tissue from transgenic fish was digested with 0.2% collagenase and 0.12% dispase as described previously (Nóbrega et al., 2010). The resulting cell suspension was immediately submitted to fluorescence activated cell sorting (FACS) using an inFlux cell sorter (BD Bioscience, San Jose, CA, USA, [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)). In some cases, the *vasa::egfp* testicular cell suspension was also submitted to a differential plating method (Luo et al., 2006) before FACS. Using this method, somatic cells adhere at the bottom of the plate while germ cells either remain in suspension after 2-3 days of culture, or are only loosely associated with the firmly adhering somatic cells (Fig. 5). Then, FACS settings were adjusted to sort Egfp positive and negative cells from total *vasa::egfp* testicular cell suspension and also from floating/loosely associated *vasa::egfp* cells after differential plating (Fig. 6 A,B). Autofluorescence was eliminated through the FACS dot plot profile

generated with a testicular cell suspension from wild-type males (Fig. 6A). Then, Egfp positive and negative cells were collected into tubes, centrifuged in PBS (phosphate buffer saline pH 7.4) for 10 min at 900 rpm, and immediately submitted to RNA extraction using RNAqueous<sup>®</sup> - Micro Kit (Ambion, Austin, TX, USA, <http://www.ambion.com>) as described before (Nóbrega et al., 2010). After cDNA synthesis, the threshold cycle (C<sub>q</sub>) values of two endogenous reference control genes (elongation factor 1- $\alpha$ , *efl $\alpha$* ; 18S rRNA) and of the following target genes were determined: cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (*cyp17a1*) (García-López et al., 2010), cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (*cyp19a1a*) (Chiang et al., 2001), steroidogenic acute regulatory protein (*star*) (García-López et al., 2010), insulin-like 3 (*insl3*) (Leydig cell-specific gene) (Good-Avila et al., 2009), gonadal soma-derived growth factor (*gsdf*) (Sertoli cell specific gene) (Gautier et al., 2011) and piwi-like2 (*piwil2*) (germ cell specific gene) (Houwing et al., 2008) by qPCR analysis was carried out as reported previously (García-López et al., 2010). Ct values of target genes (*cyp17a1*, *cyp19a1*, *star*, *insl3*, *gsdf*, and *piwil2*) were normalized with the Ct values of the more stable reference gene (*efl $\alpha$* ) (Supplemental Figure 1), and calibrated with the mean of delta Ct (dCt) of all samples according to the delta-delta Ct value method.

## 2.5. Antibodies

The immunopurified anti-Cyp19a1a antibody was purchased from Tebu-Bio (France, reference number: 55474s). According to the manufacturer, this antibody was raised in rabbit against a synthetic peptide derived from the C-terminal region of the zebrafish Cyp19a1a protein (GenBank accession # NP\_571229). Its specificity has been shown by Western-blotting using zebrafish testis extracts: only one band was detected and this band disappeared when blocked by the peptide used for immunization.

The immunopurified anti-Cyp19a1b antibody used in this study was raised in rabbit against the peptide CNSNGETADNRTSKE, corresponding to the last 15 residues (amino acids 497-511) of the zebrafish Cyp19a1b sequence (AF183908). The immunopurified anti-Cyp17a1 antibody was also raised in rabbit against two synthetic peptides (AFADYSSTWKFHRK and KVRADWEKSPLMQHC) corresponding to the amino acids 126-139 and 505-519 respectively, of the zebrafish Cyp17a1 sequence (AAP41821). These two antibodies have been shown to be specific for the Cyp19a1b protein in zebrafish brain (Menuet et al., 2005;

Vosges et al., 2010), and for the Cyp17a1 protein in zebrafish testis (De Waal et al., 2009; Hinfrey et al., 2011).

## 2.6. Western-Blot

To assess the specificity of our Cyp19a1b antibody in zebrafish testis, Western blotting procedures were conducted. The details of the whole procedure was described previously for Cyp17a1 (De Waal et al., 2009) and used in this study for Cyp19a1b without any modifications.

## 2.7. Histology

Testes were fixed in Bouin's fluid for 48 hours. After fixation, samples were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin, according to conventional procedures. Testis were longitudinally sectioned at 5  $\mu$ m and stained with hematoxylin/eosin or processed in immunohistochemistry as described below.

Morphometric analysis of testis of control and E2-exposed fish was conducted according to Feitsma et al. (2007) with some modifications. Volume fractions of various testicular tissue components were determined as the area of cysts containing cells normalized by the total area of testis analyzed to obtain a percentage of total tissue for each component. These volume fractions were determined for each of the following testicular components: type A spermatogonia, type B spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa and others (somatic cells, blood and lymphatic vessels, connective tissue and empty spaces). Four testicular sections (~ 80  $\mu$ m apart from each other) were analyzed for each fish (N = 6 per condition). The weight (mg) of each testis component was determined as the product of the volume fraction (%) and the testis weight. These quantifications were blindly performed without a priori knowledge of the specimen identity.

## 2.8. Immunohistochemistry

Sections were dewaxed and rehydrated, and antigens were unmasked for 3 hours at 80°C in EDTA buffer (pH 8.5). Tissue sections were then incubated for 1 hour in a saturation solution (PBS containing 0.2% Triton X-100 and 1% milk powder). Incubation with primary

antibodies (anti-Cyp19a1a, Cyp19a1b or anti-Cyp17a1) was performed overnight (1:300 (anti-Cyp19a1b or anti-Cyp17a1) or 1:600 (anti-Cyp19a1a) with 0.5% milk powder in PBS) at ambient temperature. After rinsing, sections were incubated for 1h30 with a goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa fluor 594 (1:200 with 0.5% milk powder in PBS). The specificity of the staining was controlled by processing adjacent sections without primary antibody or with primary antibody pre-adsorbed with the peptides (100 µg/ml) for Cyp19a1b and Cyp17a1. For immunolocalization experiments in non exposed fish from our breeding unit, and of DMSO- and E2-exposed fish, 6 adult male zebrafish were used.

## 2.9. Fluorescence analysis

Immunofluorescence was observed with a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope combined with an ApoTome (Zeiss GmbH, Germany). Micrographs were taken using the Axiovision Imaging software. All micrograph presented were series of optical sections along the z-axis that were acquired at 0.25 to 0.45 µm intervals with the 20x and 40x objectives and projected in a single image (maximum-intensity projection). Fluorescence pictures of testes of DMSO- or E2-exposed fish were all series of 20 optical sections acquired with the same time of exposure, however, the time of exposure was adjusted for each antibodies used.

## 2.10. Statistical analysis

All data presented are mean  $\pm$  standard deviation. Data were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by the Mann-Whitney U-test (SPSS software, SPSS Inc, USA). Differences between groups were considered to be significant if  $p < 0.05$ .

# 3. Results

## 3.1. Specificity of the antibodies in the zebrafish testis

The specificity of our anti-Cyp19a1b antibody was assessed by western-blot on S9 protein fractions of zebrafish testis. As shown in Figure 1, the Cyp19a1b antibody specifically recognized a single band of about 50 kDa. The observed size of protein is in agreement with

those reported in the literature for zebrafish (Menuet et al., 2005) and with the deduced molecular weight based on the amino-acid sequence.

In negative controls of immunohistochemistry experiments (no primary antibody or primary antibody pre-adsorbed with synthetic peptides), no cross-reactivity was seen for any of the three antibodies (data not shown).

### 3.3. Immunolocalization of Cyp19a1 and Cyp17a1 proteins in mature zebrafish testis

By using our specific anti-Cyp19a1 and anti-Cyp17a1 zebrafish antibodies, we localized for the first time the cellular sites of expression of the Cyp19a1a and Cyp19a1b enzymes in the zebrafish testis and confirmed and detailed the cellular sites of expression of the Cyp17a1 protein previously described (De Waal et al., 2009; Hinfray et al., 2011).

Until now, information on the identity of aromatase producing cells in the fish testis was scarce. In our study, Cyp19a1a protein was immunolabeled in the cytoplasm of Leydig cells (Fig 2 A, B) and all types of germ cells of zebrafish testis (Fig.2 A, C-F) but never localized to Sertoli cells. Cyp19a1b protein was immunolocalized in germ cells of zebrafish testis but was absent from interstitial cells (Fig. 3). Immunoreactivity was found in the cytoplasm of spermatogonia (Fig. 3 A, B, C), spermatocytes (Fig. 3 A, D) and spermatids (Fig. 3 A, E) while spermatozoa remained unlabeled (Fig. 3 A, F).

Androgens also play an important role in spermatogenesis and Cyp17 is a key enzyme for androgen synthesis. Cyp17a1 protein was immunolocalized in both germ cells and interstitial cells (Fig. 4).

Labelling of Cyp17a1 protein was observed in the cytoplasm of Leydig cells (Fig. 4 A,B), spermatogonia (Fig. 4 A,C), spermatocytes (Fig. 4 A,D), spermatids (Fig. 4 A,E) and spermatozoa (Fig. 4 A,F).

### 3.4. Expression of cyp19a1 and cyp17a1 genes in testicular germ cells enriched fractions

Only germ cells express Egfp in *vasa::egfp* transgenic animals. Still, the Egfp-positive cell fraction prepared by FACS directly after preparing the cell suspension clearly contained Sertoli cells as shown by high *gsdf* expression levels (Fig. 6D). We hypothesised that this observation reflects re-association of germ with Sertoli cells after preparing the cell



suspension until the start of the FACS procedure. We speculated that differential plating, in order to deplete somatic cells from the suspension, may reduce the contamination. Indeed, harvesting by FACS Egfp-positive cells floating or loosely associated 2 days after differential plating, clearly reduced Sertoli cell marker gene expression (Figs. 5, 6D). Further gene expression analysis showed that zebrafish *cyp19a1a* expression was equally found in the somatic (Egfp-negative) and germ cell-enriched fractions (Egfp-positive, floating or loosely associated cells sorted after differential plating) (Fig. 6D). A slight increase in *cyp19a1a* mRNA levels after reducing Sertoli cell contamination, similar to the effect seen on *piwil2* mRNA, supports the view that *cyp19a1a* is indeed expressed by germ cells also. Moreover, a clear signal for *cyp19a1a* expression in the Egfp-negative fraction (immediately sorted after preparing the cell suspension) and hence a pattern different from the Sertoli cell gene *gsdf* suggests that *cyp19a1a* expression in this fraction is attributable to Leydig cells.

*cyp17a1* expression was detected in both somatic (Egfp-negative) and germ cell-enriched cell fractions (Egfp-positive sorted after differential plating) (Fig. 6D). However, somatic *cyp17a1* mRNA seems to dominate quantitatively over germ cell associated expression, and appears associated rather with Leydig than with Sertoli cells, since its expression pattern was similar to typical Leydig cell genes (*insl3* and *star*) in the Egfp-negative fraction (Fig. 6D), and since when reducing Sertoli cell numbers by differential plating, *cyp17a1* mRNA levels increased in the germ cell enriched fraction. The latter observation moreover shows that *cyp17a1* mRNA is also present in germ cells.

### 3.5. Effect of estradiol exposure on spermatogenesis and Cyp19a1 and Cyp17a1 protein synthesis in mature zebrafish testis

In vivo exposure to 10nM of E2 either for 7 or 14 days had no effect on body weight of fish (data not shown), while a decrease in gonad weights and GSI was observed. Gonad weights significantly decreased from  $9.4 \pm 2.2$  mg to  $3.3 \pm 0.3$  mg after 14 days of E2 exposure and GSI were significantly reduced from  $1.8 \pm 0.3$  % to  $1.4 \pm 0.1$  % after 7 days and from  $2.2 \pm 0.4$  % to  $1.0 \pm 0.0$  % after 14 days.

Quantitative morphometric analysis of zebrafish testis tissue samples collected after 7 and 14 days of E2 exposure revealed clear, statistically significant shifts in the relative proportion of the different germ cell types (Fig. 7 A, B). After 7 days, a decrease of spermatocytes to 60 % of the control levels was observed (Fig. 7 A). At 14 days of E2 exposure, the main changes in

the morphometric analysis of the testis were the increase of the mass of type A spermatogonia (~ 175 % of the control level) and the decrease of the mass of type B spermatogonia (~ 32 % of the control level), of spermatocytes (~ 11 % of the control level), of spermatids (~ 25 % of the control level) and of spermatozoa (~ 43 % of the control level) (Fig. 7 B).

We then examined the effect of E2 exposure on the testicular synthesis of Cyp19a1a and b and Cyp17a1 proteins. Immunohistochemistry experiments with anti-Cyp19a1 antibodies revealed no qualitative difference between control and E2-exposed fish whatever the duration of exposure (7 and 14 days). In control and E2-exposed fish testis, Cyp19a1a immunoreactivity was observed in Leydig cells and all types of germ cells (Fig. 8), while Cyp19a1b was detected in spermatogonia, spermatocytes and spermatids (Fig. 9).

Contrary to aromatases, E2 exposure (7 and 14 days) led to a strong inhibition of Cyp17a1 protein immunolabeling in zebrafish testis (Fig. 10). Interestingly, our study revealed that this inhibition occurred only in Leydig cells and not in germ cells. Indeed, after 7 and 14 days of exposure, Cyp17a1-positive Leydig cells were absent from testis of E2-exposed fish (Fig. 10).

## 4. Discussion

### 4.1. Localization of Cyp19a1 and Cyp17a1 proteins in mature zebrafish testis

In zebrafish, the two *cyp19a1* genes were known to be expressed in the mature testis (Sawyer et al., 2006; Hinfray et al., 2011). Using immunohistochemistry experiment, we have localized here the cellular sites of expression of Cyp19a1 enzymes in the zebrafish testis. We have shown that Cyp19a1a is expressed in both, Leydig and germ cells, which has been confirmed by an independent technique based on analysing gene expression in FACS-enriched testicular cell fractions. Using immunohistochemistry, Cyp19a1b, on the other hand, was detected only in germ cells. In the serially sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*, expression of the *cyp19a1a* and *cyp19a1b* genes was detected in the testis by RT-PCR and in situ hybridization detected *cyp19a1a* mRNA in interstitial cells of the testis whereas *cyp19a1b* mRNA was not detected (Kobayashi et al., 2004). In sea bass, RT-PCR experiments revealed the presence of *cyp19a1a* in testicular germ cells (Vinas and Piferrer, 2008). In rainbow trout, while some reported no aromatase immunoreactivity in the testis (Kobayashi et al., 1998), others showed aromatase immunolabeling in germ, Leydig, and Sertoli cells although the use

of an antibody against human placental aromatase did not allow differentiating the two aromatase isoforms (Kotula-Balak et al., 2008). In a variety of mammals, aromatase has been shown to be present and functional in testicular germ cells (for review see (Carreau, 2001). Despite certain differences between studies, the localization of aromatase in testis together with the known presence of estrogen receptors in fish somatic testicular cells and germ cells (Bouma and Nagler, 2001; Wu et al., 2001; Menuet et al., 2002; Vinas and Piferrer, 2008), suggests the involvement of estrogens in fish in both major testicular functions, steroid production and spermatogenesis. Indeed, in vertebrates including fish, there is evidence to indicate that spermatogonial renewal is regulated by estradiol (Miura et al., 1999).

Like Cyp19a1a, Cyp17a1 protein and gene expression was localized both in Leydig and germ cells of zebrafish testis, with a quantitative prevalence in Leydig cells. Our results support previous reports that Leydig cells produce androgens in fish testis (Kobayashi et al., 1998; Wang and Orban, 2007; Zhou et al., 2007; De Waal et al., 2009; Hinfray et al., 2011). Recent studies also showed that the enzymes required for the production of the 11-oxygenated androgens typically found in fish (Cyp17 and Cyp11b) are present in male germ cells of fish (Vinas and Piferrer, 2008; Sreenivasulu and Senthilkumaran, 2009; Zhang et al., 2010). Androgens are required for spermatogenesis *ex vivo* (Miura et al., 1991) or *in vivo* (De Waal et al., 2009), and recently, a role for the androgens also in milt hydration or in providing the proper environment for sperm maturation/conservation has been hypothesized in fish (Rolland et al., 2009; Schulz et al., 2010).

#### 4.2. Effect of estradiol exposure on spermatogenesis and Cyp19a1 and Cyp17a1 protein synthesis in zebrafish testis

In the present study, exposure of adult male zebrafish for 7 and 14 days to 10 nM of E2 led to alterations of spermatogenesis. Indeed, - fish exposed to E2 for 14 days presented testis with an increased mass of type A spermatogonia and decreased mass of type B spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. These effects are in agreement with a previous study where zebrafish were exposed for 21 days to the same concentration of E2 (De Waal et al., 2009).

Immunohistochemistry experiments with anti-Cyp19a1 antibodies showed no evidence for a difference between control and E2-exposed fish whatever the duration of exposure (7 and 14 days). Short term exposures of fathead minnows and medaka to estrogens from 5 to 500 ng/L

during either 7 or 14 days had no effect on *cyp19a1a* gene expression in the testis (Filby et al., 2006; Zhang et al., 2008). In zebrafish, a 7 days exposure to 10nM E2 had no effect on testicular *cyp19a1a* gene expression (Hinfray and Brion, unpublished data) whereas it strikingly inhibited *cyp19a1a* gene expression in ovary (Hinfray et al., 2006). For aromatase B, some studies have shown that testicular *cyp19a1b* gene expression in fathead minnow increased following a 14 day long exposure to estrogens (Halm et al., 2002; Filby et al., 2006). In zebrafish, no effect was observed on testicular *cyp19a1b* gene expression after 5 days of exposure to 1nM E2 (Sawyer et al., 2006), or after 7 days of exposure to 10nM E2 (Hinfray and Brion, unpublished data). Neural *cyp19a1b* gene expression, on the other hand, is estrogen-sensitive in zebrafish, and it was only in glial or neuro-glial cells that stimulation of the zebrafish *cyp19a1b* gene promoter by estrogens could be demonstrated (Diotel et al., 2010). Altogether, these reports are in agreement with the absence of effect of E2 on testicular aromatases in our study.

Contrary to aromatases, E2 exposure (7 and 14 days) led to a strong inhibition of Cyp17a1 protein immunolabeling in zebrafish testis. While this observation is consistent with the estrogen-induced decrease in *cyp17a1* mRNA levels reported in fish testis (Govoroun et al., 2001; Baron et al., 2005; Brion et al., 2008; Zhang et al., 2008; De Waal et al., 2009), our study moreover revealed that this inhibition occurred only in Leydig cells but not in germ cells. Indeed, after 7 and 14 days of exposure, Cyp17a1-positive Leydig cells were absent from testis of E2-exposed fish. In the present study, perturbations of spermatogenesis were evident after 14 days of E2-exposure. It has been previously stated that estrogen treatment induced an androgen insufficiency in zebrafish testis resulting in an interruption of spermatogenesis (De Waal et al., 2009). Indeed, in zebrafish, exposures to estrogens for 7 days lead to inhibition of *cyp17a1* expression (Brion et al., 2008; De Waal et al., 2009), a decrease of testicular 11-ketotestosterone production (De Waal et al., 2009) and plasma levels (Brion, unpublished data), probably related to the disrupted spermatogenesis observed after 14 days of E2-exposure. The results of our study demonstrate that down-regulation of Cyp17a1 and hence androgen synthesis in Leydig cells is a major molecular and cellular event in the estrogen-induced perturbation of zebrafish spermatogenesis. Our findings also raise several questions as regards the expression and regulation of steroidogenic enzymes in germ cells. One might ask whether germ cells express all steroidogenic enzymes and therefore whether these cells are able to produce locally steroids *de novo*. Alternatively, the physiological significance of Cyp17a1 protein expression in germ cells may depend on the supply of

steroidal substrates from other (Leydig?) cells for androgen (and possibly subsequent estrogen) production. The principle functionality of steroidogenic enzymes in spermatozoa has been demonstrated in different vertebrates, ranging from mammals (for review see (Carreau, 2001; Carreau et al., 2006) to fish (Sakai et al., 1989; Asahina et al., 1990; Asahina et al., 1994). However, irrespective of the enzymes' functionality, it is unclear at present why Cyp17a1 synthesis was not down-regulated by E2 in germ cells, in contrast to Leydig cells. It can be hypothesized that only in Leydig cells there is an appropriate cellular context for transcriptional inhibition by E2 or that the Sertoli cell barrier plays a protective role as regards to estrogens. Another hypothesis could be that E2 might exert a negative feedback on brain/pituitary by inhibiting gonadotropins release. This negative feedback could lead to a decreasing stimulation of the Fsh-regulated cyp17a1 expression which might explain the inhibition of Cyp17a1 synthesis in Leydig cells which are known to express gonadotropin receptors in contrast to germ cells (Garcia-Lopez et al., 2010).

## **5. Conclusion**

In summary, our study provides new data on the cellular localization and expression of Cyp19a1 and Cyp17a1 in the zebrafish testis. Cyp19a1b is synthesized only by germ cells (spermatogonia, spermatocytes and spermatids) while Cyp19a1a and Cyp17a1 are synthesized by Leydig cells and all types of germ cells; as regards Cyp17a1, both protein and mRNA seem to be quantitatively dominating in Leydig cells. Further, we demonstrate that E2 exposure had no effect on the synthesis of these proteins in germ cells but suppressed Cyp17a1 synthesis in Leydig cells after 7 and 14 days of exposure. The estrogen-induced androgen insufficiency in Leydig cells is a major event in altering spermatogenesis and suggests that germ cells steroidogenesis may have to be fuelled by precursors from Leydig cells. Further studies are needed to elucidate the functionality of steroidogenic enzymes in germ cells and their potential role in the testicular physiology.

## 7. References

- Asahina, K., Barry, T.P., Aida, K., Fusetani, N., Hanyu, I., 1990. Biosynthesis of 17-Alpha,20-Alpha-Dihydroxy-4-Pregnen-3-One from 17-Alpha-Hydroxyprogesterone by Spermatozoa of the Common Carp, *Cyprinus-Carpio*, *Journal of Experimental Zoology*, 255 (2), 244-249.
- Asahina, K., Lambert, J.G.D., Goos, H.J.T., 1994. Bioconversion of 17-Alpha-Hydroxyprogesterone into 17-Alpha,20-Alpha-Dihydroxy-4-Pregnen-3-One and 17-Alpha,20-Beta-Dihydroxy-4-Pregnen-3-One by Flounder (*Platichthys-Flesus*) Spermatozoa, *Zoological Science*, 11 (6), 859-863.
- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55 910-931.
- Baron, D., Fostier, A., Breton, B., Guiguen, Y., 2005. Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Mol Reprod Dev*, 71 (4), 471-9.
- Blazquez, M., Piferrer, F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Molecular and Cellular Endocrinology*, 219 (1-2), 83-94.
- Bouma, J., Nagler, J.J., 2001. Estrogen receptor-alpha protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle, *Biology of Reproduction*, 65 (1), 60-65.
- Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17[beta]-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 68 (3), 193-217.
- Brion, F., Hinfray, N., Palluel, O., Maillard, J., Anglade, I., Ait-Aissa, S., Kah, O., Porcher, J.M., 2008. Effect of (xeno)-estrogens on zebrafish P450c17 (C17,17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) mRNA and protein expression in gonadal tissue, *Cybiuim*, 32 (2), 245-246.
- Carreau, S., 2001. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178 (1-2), 65-72.
- Carreau, S., Delalande, C., Silandre, D., Bourguiba, S., Lambard, S., 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246 (1-2), 65-68.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2011. Estrogens: new players in spermatogenesis, *Reprod Biol*, 11 (3), 174-93.
- Cavaco, J.E., Van Blijswijk, B., Leatherland, J.F., Goos, H.J., Schulz, R.W., 1999. Androgen-induced changes in Leydig cell ultrastructure and steroidogenesis in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*, *Cell Tissue Res*, 297 (2), 291-9.
- Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 82 (1), 19-32.
- De Waal, P.P., Leal, M.C., Garcia-Lopez, A., Liarte, S., De Jonge, H., Hinfray, N., Brion, F., Schulz, R.W., Bogerd, J., 2009. Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis, *J Endocrinol*, 202 (2), 287-97.

- Diotel, N., Page, Y.L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B.-C., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31 (2), 172-192.
- Feitsma, H., Leal, M.C., Moens, P.B., Cuppen, E., Schulz, R.W., 2007. Mlh1 deficiency in zebrafish results in male sterility and aneuploid as well as triploid progeny in females, *Genetics*, 175 (4), 1561-9.
- Filby, A.L., Thorpe, K.L., Tyler, C.R., 2006. Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish, *J Mol Endocrinol*, 37 (1), 121-34.
- Garcia-Lopez, A., De Jonge, H., Nobrega, R.H., De Waal, P.P., Van Dijk, W., Hemrika, W., Taranger, G.L., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2010. Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins, *Endocrinology*, 151 (5), 2349-60.
- Govoroun, M., Mcmeel, O.M., Mecherouki, H., Smith, T.J., Guiguen, Y., 2001. 17 $\beta$ -estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis, *Endocrinology*, 142 (5), 1841-8.
- Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2002. Exposure to exogenous 17 $\beta$ -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Aquatic Toxicology*, 60 (3-4), 285-299.
- Halm, S., Kwon, J.Y., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Pounds, N., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2003. Cloning and gene expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*, *General and Comparative Endocrinology*, 130 (3), 256-266.
- Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Toxicology*, 21 (4), 332-7.
- Hinfray, N., Baudiffier, D., Leal, M.C., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., Le Gac, F., Schulz, R.W., Brion, F., 2011. Characterization of testicular expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole, *Gen Comp Endocrinol*, 174 (3), 309-17.
- Kobayashi, T., Nakamura, M., Kajiura-Kobayashi, H., Young, G., Nagahama, Y., 1998. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, P450<sub>arom</sub>, and 3 $\beta$ -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Cell and Tissue Research*, 292 (3), 573-577.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., Sunobe, T., Morrey, C.E., Suzuki, N., Nagahama, Y., 2004. Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*, *Zoolog Sci*, 21 (4), 417-25.
- Kotula-Balak, M., Zielinska, R., Glogowski, J., Kowalski, R.K., Sarosiek, B., Bilinska, B., 2008. Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149 (2), 188-196.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions, *Biology of Reproduction*, 66 (6), 1881-92.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene, *J Comp Neurol*, 485 (4), 304-20.

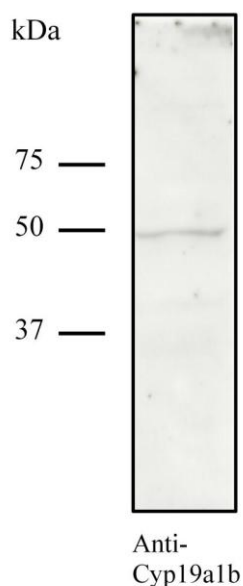


- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (13), 5774-8.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., Yamauchi, K., 1999. Estradiol-17[ $\beta$ ] Stimulates the Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Males, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264 (1), 230-234.
- Rolland, A.D., Lareyre, J.J., Goupil, A.S., Montfort, J., Ricordel, M.J., Esquerre, D., Hugot, K., Houlgatte, R., Chalmel, F., Le Gac, F., 2009. Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis, *BMC Genomics*, 10 546.
- Sakai, N., Ueda, H., Suzuki, N., Nagahama, Y., 1989. Involvement of Sperm in the Production of 17- $\alpha$ ,20-Beta-Dihydroxy-4-Pregnen-3-One in the Testis of Spermiating Rainbow-Trout, *Salmo-Gairdneri*, *Biomedical Research-Tokyo*, 10 (2), 131-138.
- Sawyer, S.J., Gerstner, K.A., Callard, G.V., 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation, *General and Comparative Endocrinology*, 142 (2), 108-117.
- Schulz, R.W., Liemburg, M., García-López, Á., Dijk, W.V., Bogerd, J., 2008. Androgens modulate testicular androgen production in African catfish (*Clarias gariepinus*) depending on the stage of maturity and type of androgen, *General and Comparative Endocrinology*, 156 (1), 154-163.
- Schulz, R.W., De França, L.R., Lareyre, J.-J., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish, *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3), 390-411.
- Sreenivasulu, G., Senthilkumaran, B., 2009. A role for cytochrome P450 17[ $\alpha$ ]-hydroxylase/c17-20 lyase during shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 115 (3-5), 77-85.
- Vinas, J., Piferrer, F., 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads, *Biology of Reproduction*, 79 (4), 738-47.
- Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B.C., Combarrous, Y., Porcher, J.M., Kah, O., Brion, F., 2010. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish, *Aquatic Toxicology*, 99 (4), 479-91.
- Wang, X.G., Orban, L., 2007. Anti-Mullerian hormone and 11 beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males, *Dev Dyn*, 236 (5), 1329-38.
- Wu, C., Patino, R., Davis, K.B., Chang, X., 2001. Localization of estrogen receptor alpha and beta RNA in germinal and nongerminal epithelia of the channel catfish testis, *Gen Comp Endocrinol*, 124 (1), 12-20.
- Yu, H., Cheng, H., Guo, Y., Xia, L., Zhou, R., 2003. Alternative splicing and differential expression of P450c17 (CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307 (1), 165-171.
- Zhang, W.-L., Zhou, L.-Y., Senthilkumaran, B., Huang, B.-F., Sudhakumari, C.C., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Wang, D.-S., 2010. Molecular cloning of two isoforms of 11[ $\beta$ ]-hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *General and Comparative Endocrinology*, 165 (1), 34-41.
- Zhang, X., Hecker, M., Park, J.-W., Tompsett, A.R., Newsted, J., Nakayama, K., Jones, P.D., Au, D., Kong, R., Wu, R.S.S., Giesy, J.P., 2008. Real-time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis of the Japanese medaka, *Aquatic Toxicology*, 88 (3), 173-182.

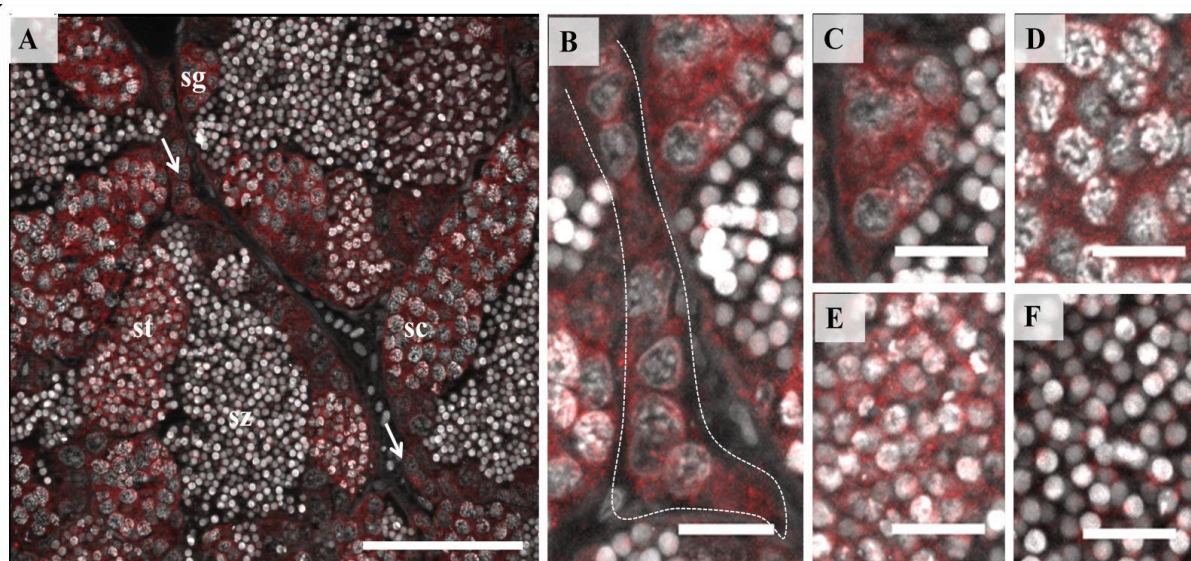
Zhou, L.Y., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yano, A., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Sakai, F., Nagahama, Y., 2007. A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney, *Endocrinology*, 148 (9), 4282-91.

## Figure caption

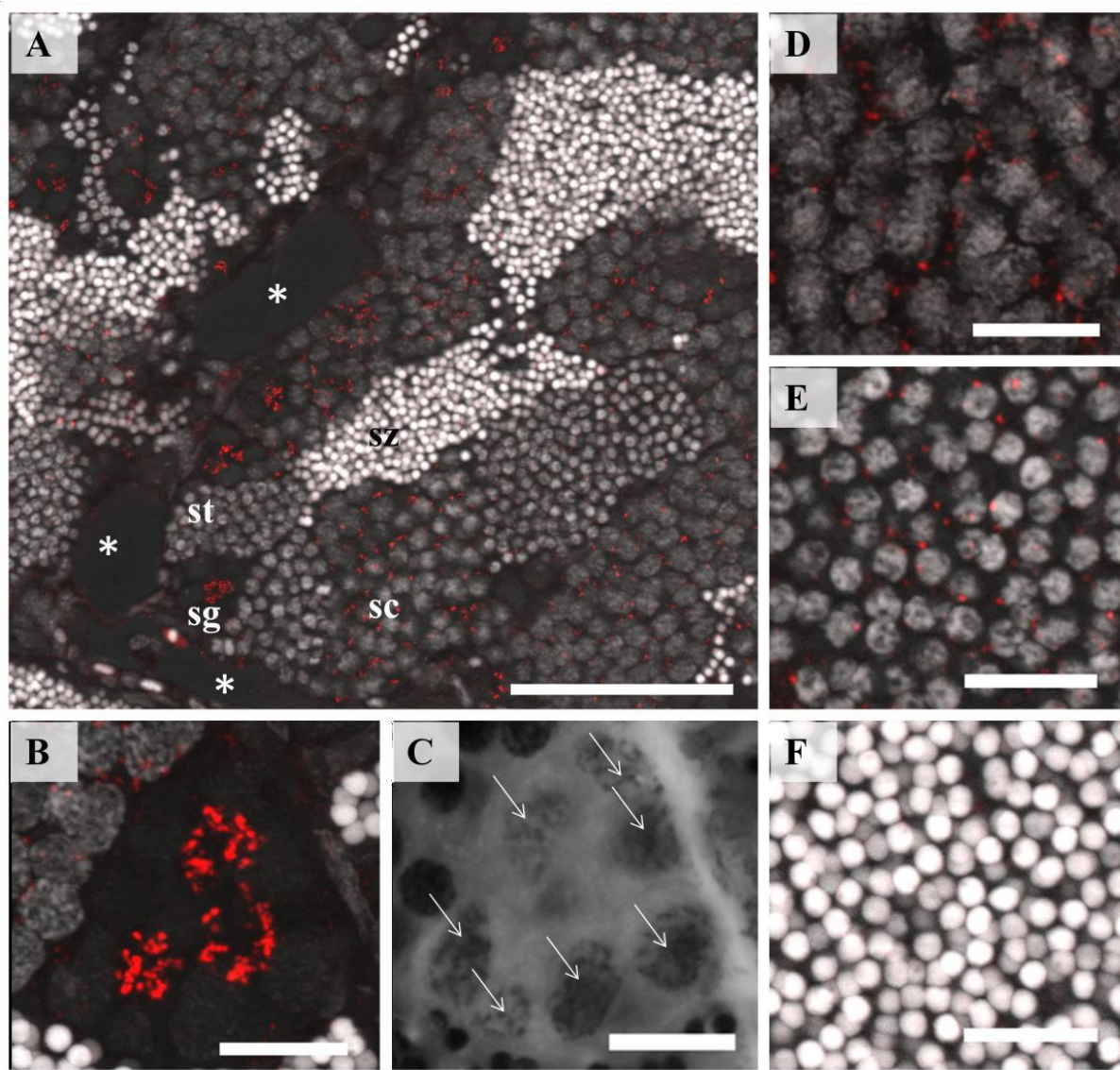
**Figure 1 :** Immunoblot on zebrafish (*Danio rerio*) mature testis Cyp19a1b protein. The anti-Cyp19a1b antibody detected one band of about 50 kDa.



**Figure 2:** Immunolocalization of Cyp19a1a protein in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*). (A) Representative micrograph (from  $n = 6$  fish) of Cyp19a1a immunoreactive cells (red). Arrows indicate Leydig cells. Higher magnifications show that immunoreactivity was localized in the cytoplasm of Leydig cells (B), spermatogonia (C), spermatocytes (D), spermatids (E) and spermatozoa (F). sc: spermatocytes, sg: spermatogonia, st: spermatids, sz: spermatozoa. White: Hoechst staining. Scale Bars = 50  $\mu\text{m}$  (A) and 10  $\mu\text{m}$  (B-F).

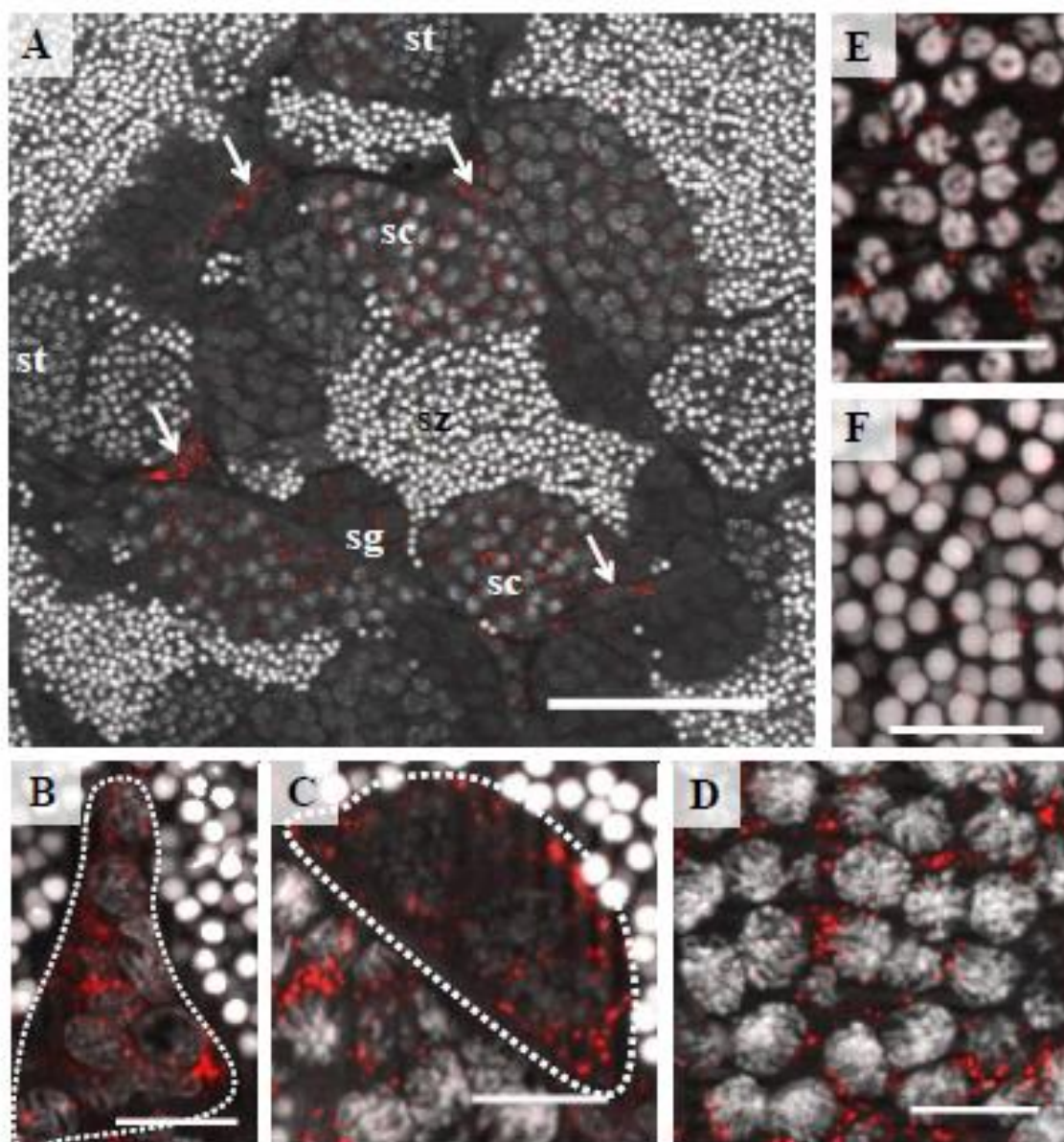


**Figure 3:** Immunolocalization of Cyp19a1b protein in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*). (A) Representative micrograph (from n = 6 fish) of Cyp19a1b immunoreactive cells (red). Higher magnifications show that immunoreactivity was localized in the cytoplasm of spermatogonia (B), spermatocytes (D), spermatids (E) but not spermatozoa (F). (C) Haematoxylin-Eosin staining showing the localization of spermatogonia nucleus (arrows). \*: natural holes in the testis tissue. sc: spermatocytes, sg: spermatogonia, st: spermatids, sz: spermatozoa. White: Hoechst staining. Scale Bars = 50  $\mu$ m (A) and 10  $\mu$ m (B-F).



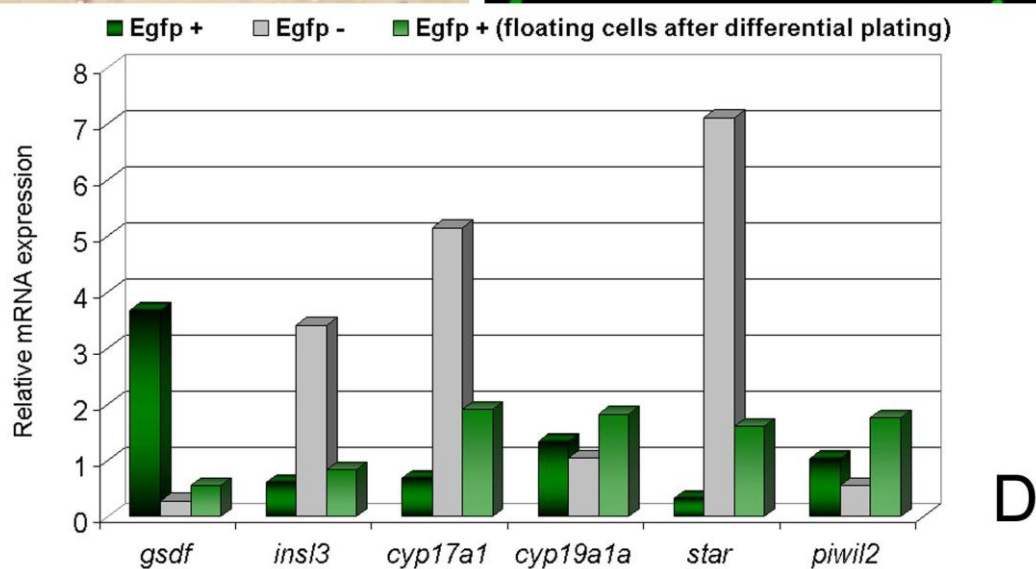
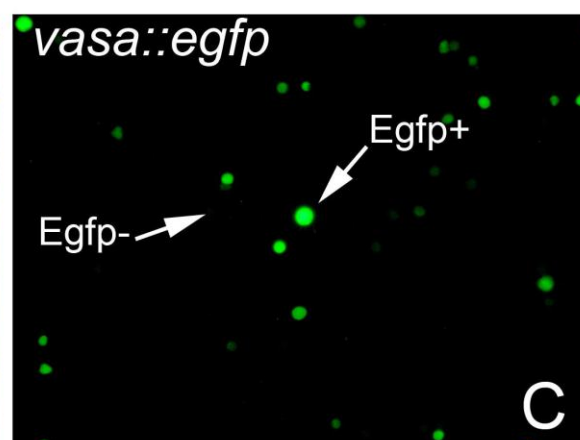
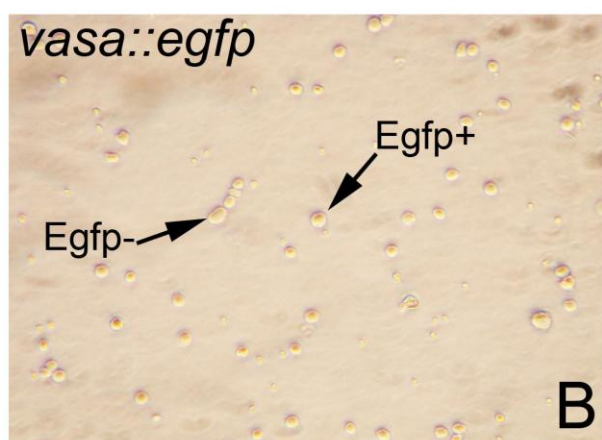
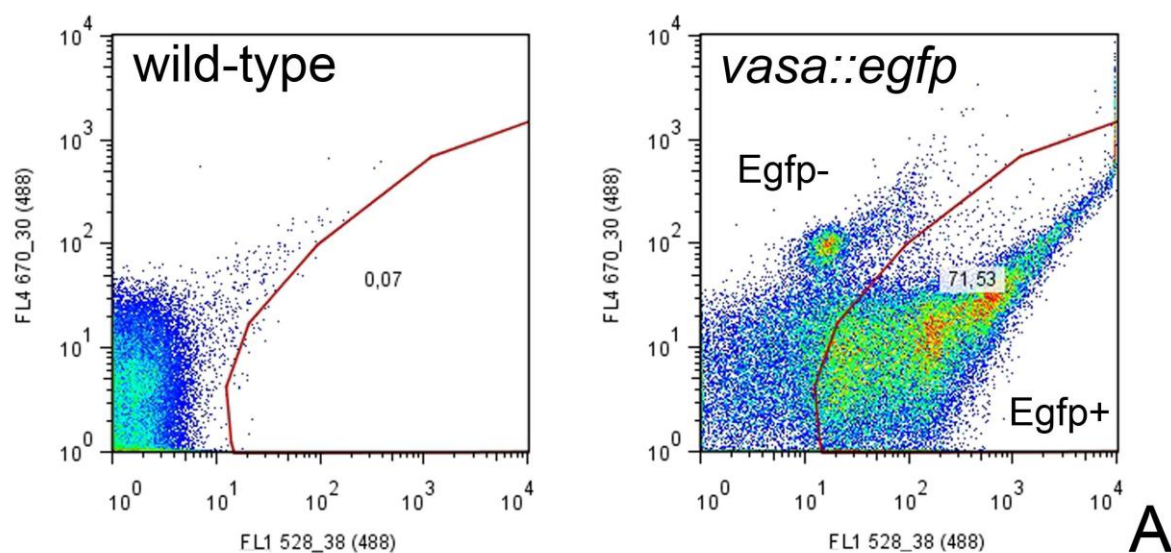


**Figure 4:** Immunolocalization of Cyp17a1 protein in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*). (A) Representative micrograph (from n = 6 fish) of Cyp17a1 immunoreactive cells (red). Arrows indicate Leydig cells. Higher magnifications show that immunoreactivity was localized in the cytoplasm of Leydig cells (B), spermatogonia (C), spermatocytes (D), spermatids (E) and spermatozoa (F). sc: spermatocytes, sg: spermatogonia, st: spermatids, sz: spermatozoa. White: Hoechst staining. Scale Bars = 50  $\mu$ m (A) and 10  $\mu$ m (B-F).



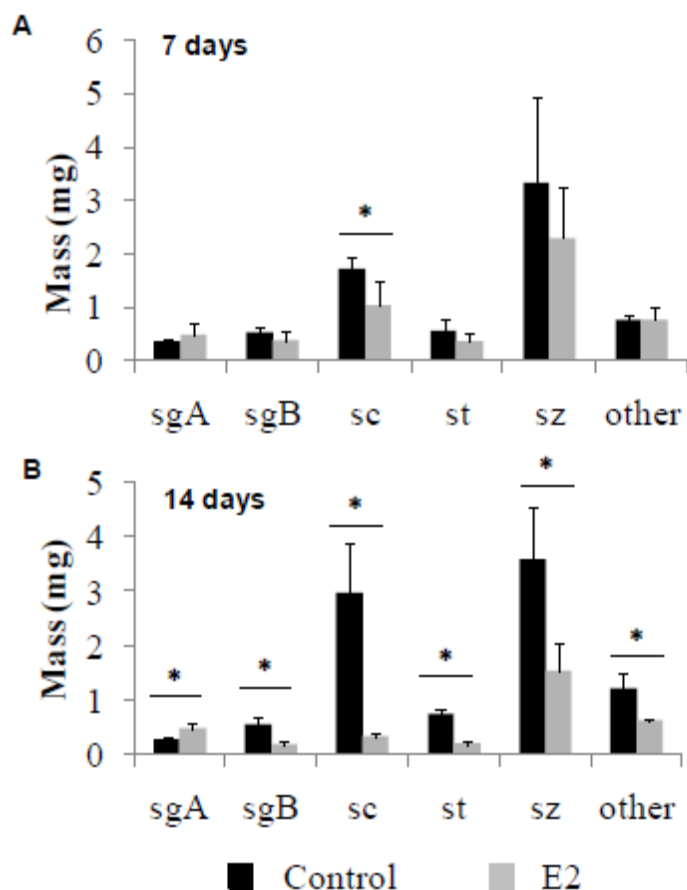
**Figure 5:** Differential Plating Method. A. Scheme showing the differential plating method adapted for zebrafish testicular cell suspension from Luo et al. (2006). A total cell suspension (fraction 1) was obtained from zebrafish testes, and harvested in cell culture medium (L-15). After 2 days of culture, only somatic cells with adhesive properties (Sertoli cells, blue triangular symbols; Leydig cells, yellow oval symbols) adhere to the bottom of the plate (Fraction 2), while germ cells (non-adherent cells; green symbols reflecting their transgenic *vasa::egfp* state) remain floating, or attach loosely to the firmly attached Sertoli cells. After an extensive washing step, it is possible to remove floating germ cells and also those germ cells weakly attached to the somatic cells, leaving the adherent somatic cells (Sertoli cells, Leydig cells, fibroblast and others – Fraction 3) at the bottom of the plate. This method is called differential plating due to the different adhesive properties of the different testicular cell types. B,C. Fraction 1. Floating cells: adherent and non-adherent cells which can be isolated or in groups. GC (germ cell). D,E. Fraction 2. Somatic cells (SC) with adhesive properties at the bottom of the plate. Arrow shows interaction between somatic cells and germ cells (GC). F,G. Fraction 3. After extensive washing, somatic adherent cells (SC) remain attached to the bottom of the plate, while the floating and the weakly attached germ cells were removed.

**Figure 6:** A. FACS dot plot profile obtained from wild-type (left) and *vasa::egfp* transgenic zebrafish (right) testicular cell suspension. Each dot represents one single event (one cell), x axis represents the intensity of Egfp (more to the right – more Egfp, while more to the left less or no Egfp), y axis represents another filter which was used to evaluate autofluorescence. Selected area in the right graph shows the Egfp positive population which was sorted by FACS; the rest consists the Egfp negative fraction. B,C. Testicular cell suspension from *vasa::egfp* transgenic animals before FACS analysis, showing Egfp positive and negative cells. B: DIC microscopy. C: Fluorescence microscopy. D. mRNA relative expression of several testicular genes (*gsdf*, *insl3*, *cyp17a1*, *cyp19a1a*, *star*, and *piwil2*) in the different cell fractions: Egfp + (immediately sorted after cell suspension), Egfp – (immediately sorted after cell suspension), and Egfp + sorted after differential plating (2 days after culture) to reduce somatic cell numbers and to enrich germ cells.

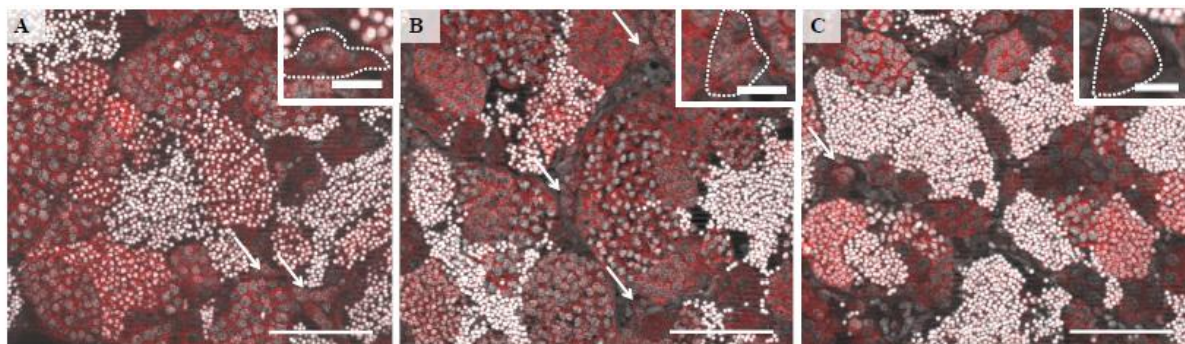




**Figure 7:** Zebrafish spermatogenesis after exposure to 10 nM E2 in vivo. Morphometric analysis ( $n = 6$  fish per condition) of zebrafish testis sections ( $n = 4$  per fish) after 7 days (A) and 14 days (B) of E2 exposure, presenting data as mass (mg) of testicular cell types. . SgA: type A spermatogonia, sgB: type B spermatogonia, sc: spermatocytes, st: spermatids, sz: spermatozoa. Bars marked with \* are significantly different from their respective control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 8:** Immunolocalization of Cyp19a1a protein in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to 10 nM of estradiol. Representative micrograph (from  $n = 6$  fish) of Cyp19a1a immunoreactive cells (red) in control fish (A) and E2-exposed fish after 7 days (B) and 14 days (C). Immunoreactivity was localized in the cytoplasm of Leydig cells (arrows), spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa in all fish. Insets show immunoreactive Leydig cells at higher magnification. White: Hoechst staining. Scale Bars = 50  $\mu\text{m}$ . Scale bars in insets = 10  $\mu\text{m}$



**Figure 9:** Immunolocalization of Cyp19a1b protein in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to 10 nM of estradiol. Representative micrograph (from  $n = 6$  fish) of Cyp19a1b immunoreactive cells (red) in control fish (A) and E2-exposed fish after 7 days (B) and 14 days (C). Immunoreactivity was localized in the cytoplasm of spermatogonia, spermatocytes and spermatids in all fish. White: Hoechst staining. Scale Bars = 50  $\mu\text{m}$ .

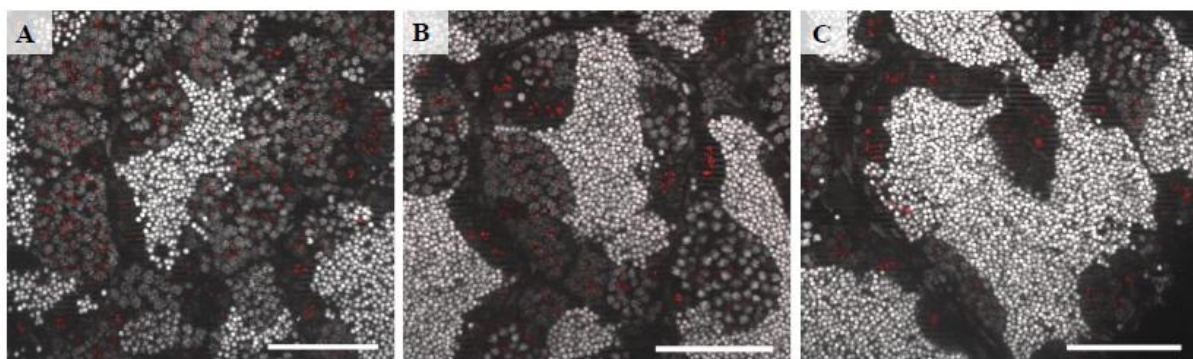
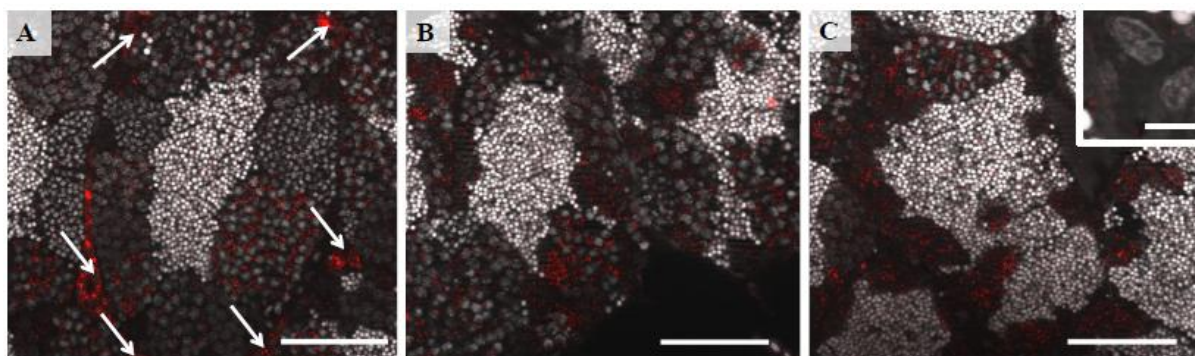


Figure 10: Immunolocalization of Cyp17a1 protein in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to 10 nM of estradiol. Representative micrograph (from n = 6 fish) of Cyp17a1 immunoreactive cells (red) in control fish (A) and E2-exposed fish after 7 days (B) and 14 days (C). Immunoreactivity was localized in the cytoplasm of Leydig cells (arrows) and germ cells in control fish. After both 7 and 14 days of E2-exposure, Cyp17a1 protein could not be detected in Leydig cells. Inset in (C) shows Leydig cells at higher magnification. White: Hoechst staining. Scale Bars = 50  $\mu$ m. Scale bar in inset = 5  $\mu$ m.



**Supplemental Figure 1:** Scatter plot to check the stability of 18S rRNA and *ef1 $\alpha$*  mRNAs as a housekeeping gene in the different cell fractions. Each dot in the scatter plot represents the average Ct-value of duplicate measurements for each cell fraction. Stability was best for *ef1 $\alpha$* .

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abraham, E., Palevitch, O., Ijiri, S., Du, S. J., Gothilf, Y. and Zohar, Y. (2008). "Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor." Journal of Neuroendocrinology **20**(3): 394-405.
- Almeida, F. F. L., Kristoffersen, C., Taranger, G. L. and Schulz, R. W. (2008). "Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): A novel model of cystic germ cell development." Biology of Reproduction **78**(1): 27-34.
- Alsop, D., Matsumoto, J., Brown, S. and Van Der Kraak, G. (2008). "Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish." General and Comparative Endocrinology **156**(1): 51-62.
- Altundag, K. and Ibrahim, N. K. (2006). "Aromatase inhibitors in breast cancer: An overview." Oncologist **11**(6): 553-562.
- Amer, M. A., Miura, T., Miura, C. and Yamauchi, K. (2001). "Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*)." Biology of Reproduction **65**(4): 1057-1066.
- Andersen, H. R., Vinggaard, A. M., Rasmussen, T. H., Gjermansen, I. M. and Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2002). "Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro." Toxicology and Applied Pharmacology **179**(1): 1-12.
- Andreu-Sanchez, O., Paraiba, L. C., Jonsson, C. M. and Carrasco, J. M. (2010). "Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (*Danio rerio*)." Environmental Toxicology **27**(2): 109-116.
- Ankley, G. T., Bencic, D. C., Cavallin, J. E., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Martinovic, D., Mueller, N. D., Wehmas, L. C. and Villeneuve, D. L. (2009). "Dynamic Nature of Alterations in the Endocrine System of Fathead Minnows Exposed to the Fungicide Prochloraz." Toxicological Sciences **112**(2): 344-353.
- Ankley, G. T., Cavallin, J. E., Durhan, E. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Thomas, L. M., Wehmas, L. C. and Villeneuve, D. L. (2012). "A time-course analysis of effects of the steroidogenesis inhibitor ketoconazole on components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of fathead minnows." Aquatic Toxicology **114-115**: 88-95.
- Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Blake, L. S., Greene, K. J., Johnson, R. D. and Villeneuve, D. L. (2007). "Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): Reproductive toxicity and biological compensation." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(6): 1214-1223.
- Ankley, G. T., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hornung, M. W., Korte, J. J., Makynen, E. A. and Leino, R. L. (2002). "Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*)." Toxicological Sciences **67**(1): 121-130.
- Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T. M., Mortensen, A. S. and Brakstad, O. G. (2008). "Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil." Environmental Research **107**(3): 362-370.
- Ayub, M. and Levell, M. J. (1987). "Inhibition of Testicular 17-Alpha-Hydroxylase and 17,20-Lyase but Not 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase-Isomerase or 17-Beta-Hydroxysteroid Oxidoreductase by Ketoconazole and Other Imidazole Drugs." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **28**(5): 521-531.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X. H., Fellous, M., Guiguen, Y. and Veitia, R. A. (2004). "An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation." Journal of Molecular Endocrinology **33**(3): 705-715.
- Baron, D., Fostier, A., Breton, B. and Guiguen, Y. (2005). "Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Molecular Reproduction and Development **71**(4): 471-479.
- Bermanian, V., Male, R. and Goksøyr, A. (2004). "The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ERalpha-signalling pathways." Comp Hepatol.
- Birkhoj, M., Nellemann, C., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H. R., Dalgaard, M. and Vinggaard, A. M. (2004). "The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides." Toxicology and Applied Pharmacology **201**(1): 10-20.

- Bitman, J., Cecil, H. C. and Fries, G. F. (1970). "Inhibition of Avian Shell Gland Carbonic Anhydrase by Ddt." Federation Proceedings **29**(2): A349-&.
- Borg, B. (1994). "Androgens in Teleost Fishes." Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology **109**(3): 219-245.
- Brion, F., Hinfray, N., Palluel, O., Maillard, J., Anglade, I., Ait-Aissa, S., Kah, O. and Porcher, J. M. (2008). "Effect of (xeno)-estrogens on zebrafish P450c17 (C17,17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) mRNA and protein expression in gonadal tissue." Cybiu **32**(2): 245-246.
- Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A. and Porcher, J. M. (2002). "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(8): 1699-1708.
- Bromilow, R. H., Evans, A. A. and Nicholls, P. H. (1999a). "Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations." Pesticide Science **55**(12): 1129-1134.
- Bromilow, R. H., Evans, A. A. and Nicholls, P. H. (1999b). "Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 2. Field studies." Pesticide Science **55**(12): 1135-1142.
- Brown, A. R., Bickley, L. K., Le Page, G., Hosken, D. J., Paull, G. C., Hamilton, P. B., Owen, S. F., Robinson, J., Sharpe, A. D. and Tyler, C. R. (2011). "Are Toxicological Responses in Laboratory (Inbred) Zebrafish Representative of Those in Outbred (Wild) Populations? - A Case Study with an Endocrine Disrupting Chemical." Environmental Science & Technology **45**(9): 4166-4172.
- Bryan, G. and Gibbs, P. (1991). "Impact of low concentrations of tributyltin (previous termTBT) next term on marine organisms: A review." Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications Lewis Publishers Inc. pp.: 323-361.
- Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Nordholm, L., Thogersen, H., Xia, G. L., Wassmann, O., Andersen, J. V., Guddal, E. and Roed, T. (1995). "Chemical-Structure of Sterols That Activate Oocyte Meiosis." Nature **374**(6522): 559-562.
- Campbell, B., Dickey, J. T. and Swanson, P. (2003). "Endocrine changes during onset of puberty in male spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*." Biology of Reproduction **69**(6): 2109-2117.
- Chang, X. T., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C. C. and Nagahama, Y. (2005). "Two types of distribution aromatase with different encoding genes, tissue and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." General and Comparative Endocrinology **141**(2): 101-115.
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H. and Eggen, R. I. L. (2007). "Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor." Toxicological Sciences **96**(2): 255-267.
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O. and Eggen, R. I. L. (2008). "Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish." General and Comparative Endocrinology **155**(1): 31-62.
- Clermont, Y. (1972). "Kinetics of Spermatogenesis in Mammals - Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal." Physiological Reviews **52**(1): 198-&.
- Colborn, T. and Clement, C. (1992). "Chemically-induced alterations in sexual and functional development-- the wildlife/human connection." Colborn T CC, eds, editor: Princeton Scientific Pub. Co.
- Colborn, T., Saal, F. S. V. and Soto, A. M. (1993). "Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans." Environmental Health Perspectives **101**(5): 378-384.
- Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J. M., Balaguer, P. and Ait-Aissa, S. (2009). "A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens." Toxicology in Vitro **23**(8): 1450-1454.
- de Waal, P. P., Leal, M. C., Garcia-Lopez, A., Liarte, S., de Jonge, H., Hinfray, N., Brion, F., Schulz, R. W. and Bogerd, J. (2009). "Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis." Journal of Endocrinology **202**(2): 287-297.

- de Waal, P. P., Wang, D. S., Nijenhuis, W. A., Schulz, R. W. and Bogerd, J. (2008). "Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (*Danio rerio*) testis." *Reproduction* **136**(2): 225-234.
- DeLorenzo, M. E., Thompson, B., Cooper, E., Moore, J. and Fulton, M. H. (2012). "A long-term monitoring study of chlorophyll, microbial contaminants, and pesticides in a coastal residential stormwater pond and its adjacent tidal creek." *Environmental Monitoring and Assessment* **184**(1): 343-359.
- di Masi, A., De Marinis, E., Ascenzi, P. and Marino, M. (2009). "Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects." *Molecular Aspects of Medicine* **30**(5): 297-343.
- DiNapoli, L. and Capel, B. (2008). "SRY and the standoff in sex determination." *Molecular Endocrinology* **22**(1): 1-9.
- Diotel, N., Do Rego, J. L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M. M., Mironov, S., Vaudry, H. and Kah, O. (2011). "Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish." *European Journal of Neuroscience* **34**(1): 45-56.
- Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S. K., Pellegrini, E., Valliant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B. C. and Kah, O. (2010). "Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions." *Frontiers in Neuroendocrinology* **31**(2): 172-192.
- Eaton, R. C. and Farley, R. D. (1974). "Spawning Cycle and Egg-Production of Zebrafish, *Brachydanio-Rerio*, in Laboratory." *Copeia*(1): 195-204.
- Eil, C. (1992). "Ketoconazole Binds to the Human Androgen Receptor." *Hormone and Metabolic Research* **24**(8): 367-370.
- Ekins, S., Chang, C., Mani, S., Krasowski, M. D., Reschly, E. J., Iyer, M., Kholodovych, V., Ai, N., Welsh, W. J., Sinz, M., Swaan, P. W., Patel, R. and Bachmann, K. (2007). "Human pregnane X receptor antagonists and Agonists define molecular requirements for different binding sites." *Molecular Pharmacology* **72**(3): 592-603.
- EspinellIngroff, A. (1997). "Clinical relevance of antifungal resistance." *Infectious Disease Clinics of North America* **11**(4): 929-&.
- Feitsma, H., Leal, M. C., Moens, P. B., Cuppen, E. and Schulz, R. W. (2007). "Mlh1 deficiency in zebrafish results in male sterility and aneuploid as well as triploid progeny in females." *Genetics* **175**(4): 1561-1569.
- Filby, A. L., Thorpe, K. L. and Tyler, C. R. (2006). "Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish." *Journal of Molecular Endocrinology* **37**(1): 121-134.
- Fishman, M. C. (2001). "Genomics - Zebrafish - The canonical vertebrate." *Science* **294**(5545): 1290-1291.
- Forlano, P. M., Deitcher, D. L., Myers, D. A. and Bass, A. H. (2001). "Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: Aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source." *Journal of Neuroscience* **21**(22): 8943-8955.
- Garcia-Lopez, A., Bogerd, J., Granneman, J. C. M., van Dijk, W., Trant, J. M., Taranger, G. L. and Schulz, R. W. (2009). "Leydig Cells Express Follicle-Stimulating Hormone Receptors in African Catfish." *Endocrinology* **150**(1): 357-365.
- Garcia-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R. H., de Waal, P. P., van Dijk, W., Hemrika, W., Taranger, G. L., Bogerd, J. and Schulz, R. W. (2010). "Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular Expression Patterns of Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Testis and Unexpected Functional Differentiation of the Gonadotropins." *Endocrinology* **151**(5): 2349-2360.
- Ge, W. (2005). "Gonadotropins and their paracrine signaling network in the zebrafish ovary." *Fish Physiology and Biochemistry* **31**(2-3): 209-214.
- Georgopapadakou, N. H. (1998). "Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs." *Current Opinion in Microbiology* **1**(5): 547-557.
- Gonzalez, A. and Piferrer, F. (2002). "Characterization of aromatase activity in the sea bass: Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes." *Journal of Experimental Zoology* **293**(5): 500-510.



- Good-Avila, S. V., Yegorov, S., Harron, S., Bogerd, J., Glen, P., Ozon, J. and Wilson, B. C. (2009). "Relaxin gene family in teleosts: phylogeny, syntenic mapping, selective constraint, and expression analysis." *Bmc Evolutionary Biology* **9**: 19.
- Gothilf, Y., MunozCueto, J. A., Sagrillo, C. A., Selmanoff, M., Chen, T. T., Kah, O., Elizur, A. and Zohar, Y. (1996). "Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): Complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization." *Biology of Reproduction* **55**(3): 636-645.
- Govoroun, M., Chyb, J. and Breton, B. (1998). "Immunological cross-reactivity between rainbow trout GTH I and GTH II and their alpha and beta subunits: Application to the development of specific radioimmunoassays." *General and Comparative Endocrinology* **111**(1): 28-37.
- Govoroun, M., McMeel, O. M., Mecherouki, H., Smith, T. J. and Guiguen, Y. (2001). "17 beta-estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis." *Endocrinology* **142**(5): 1841-1848.
- Gray, L. E., Wilson, V. S., Stoker, T., Lambright, C., Furr, J., Noriega, N., Howdeshell, K., Ankley, G. T. and Guillette, L. (2006). "Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals." *International Journal of Andrology* **29**(1): 96-104.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M. Y., Engel, W. and Hasenfuss, G. (2006). "Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis." *Nature* **440**(7088): 1199-1203.
- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2006). "Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance." *Annales De Biologie Clinique* **64**(6): 535-548.
- Heneweer, M., van den Berg, M. and Sanderson, J. T. (2004). "A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase." *Toxicology Letters* **146**(2): 183-194.
- Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A. R. and Barcelo, D. (2006). "Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments." *Talanta* **69**(2): 334-342.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W. and Peterson, R. E. (2005). "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity." *Toxicological Sciences* **86**(1): 6-19.
- Hilton, M. J. and Thomas, K. V. (2003). "Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1015**(1-2): 129-141.
- Hinfray, N., Porcher, J. M. and Brion, F. (2006). "Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **144**(3): 252-262.
- Hitchcock, C. A. (1993). "Resistance of *Candida-Albicans* to Azole Antifungal Agents." *Biochemical Society Transactions* **21**(4): 1039-1047.
- Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Hartig, P. C., Ankley, G. T., Foster, P. M., Gray, C. L. and Gray, L. E. (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." *Toxicological Sciences* **105**(2): 235-259.
- Houwing, S., Kamminga, L. M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D. V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C. B., Plasterk, R. H. A., Hannon, G. J., Draper, B. W. and Ketting, R. F. (2007). "A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish." *Cell* **129**(1): 69-82.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. and Zumla, A. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." *Genes Immun* **6**(4): 279-284.
- Huhtaniemi, I. T. and Themmen, A. P. N. (2005). "Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes." *Endocrine* **26**(3): 207-217.
- Husoy, A. M., Myers, M. S., Willis, M. L., Collier, T. K., Celandier, M. and Goksoyr, A. (1994). "Immunohistochemical Localization of Cyp1a-Like and Cyp3a-Like Isozymes in Hepatic and

- Extrahepatic Tissues of Atlantic Cod (*Gadus-Morhua* L), a Marine Fish." Toxicology and Applied Pharmacology **129**(2): 294-308.
- Ihunnah, C. A., Jiang, M. X. and Xie, W. (2011). "Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease **1812**(8): 956-963.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2008). "Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*." Biology of Reproduction **78**(2): 333-341.
- Ikeuchi, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2001). Androgen Receptor alpha and beta in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Gonad. Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity. 40128 Bologna, Medimond S R L: 1249-1255.
- Jeng, S. R., Pasquier, J., Yueh, W. S., Chen, G. R., Lee, Y. H., Dufour, S. and Chang, C. F. (2012). "Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms." General and Comparative Endocrinology **175**(1): 163-172.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. and Tyler, C. R. (2002). "Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents." Biology of Reproduction **66**(2): 272-281.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. and Sumpter, J. P. (1998). "Widespread sexual disruption in wild fish." Environmental Science & Technology **32**(17): 2498-2506.
- Kahle, M., Buerge, I. J., Hauser, A., Muller, M. D. and Poiger, T. (2008). "Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters." Environmental Science & Technology **42**(19): 7193-7200.
- Kamei, H., Ohira, T., Yoshiura, Y., Uchida, N., Nagasawa, H. and Aida, K. (2003). "Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese Eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*." General and Comparative Endocrinology **134**(3): 244-254.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., FennerCrisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T. and Tilson, H. A. (1996). "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop." Environmental Health Perspectives **104**: 715-740.
- Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J. M., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2008). "Japanese Eel Follicle-Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of Biologically Active Recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 Cells and Their Differential Actions on the Reproductive Biology." Biology of Reproduction **79**(5): 938-946.
- Klausen, C., Tsuchiya, T., Chang, J. P. and Habibi, H. R. (2005). "PKC and ERK are differentially involved in gonadotropin-releasing hormone-induced growth hormone gene expression in the goldfish pituitary." American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology **289**(6): R1625-R1633.
- Laale, H. W. (1977). "Biology and Use of Zebrafish, *Brachydanio-Rerio* in Fisheries Research - Literature-Review." Journal of Fish Biology **10**(2): 121-&.
- Lacey, C., Basha, S., Morrissey, A. and Tobin, J. M. (2012). "Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland." Environmental Monitoring and Assessment **184**(2): 1049-1062.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R. and Porte, C. (2004). "First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River." Toxicology and Applied Pharmacology **196**(2): 247-257.
- Le Gac, F., Lareyre, J. J., Montfort, J., Esquerre, D. and Houlgatte, R. (2008). "Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout." Cybiurn **32**(2): 119-121.

- Le Gac, F., Loir, M., LeBail, P. Y. and Ollitrault, M. (1996). "Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and sertoli cells." Molecular Reproduction and Development **44**(1): 23-35.
- Leal, M. C., de Waal, P. P., Garcia-Lopez, A., Chen, S. X., Bogerd, J. and Schulz, R. W. (2009). "Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo." General and Comparative Endocrinology **162**(2): 134-138.
- Legler, J., Zeinstra, L. M., Schuitemaker, F., Lanser, P. H., Bogerd, J., Brouwer, A., Vethaak, A. D., De Voogt, P., Murk, A. J. and Van der Burg, B. (2002). "Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity." Environmental Science & Technology **36**(20): 4410-4415.
- Lele, Z. and Krone, P. H. (1996). "The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research." Biotechnology Advances **14**(1): 57-72.
- Lemaire, G., de Sousa, G. and Rahmani, R. (2004). "A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides." Biochem. Pharmacol. **68**(12): 2347-2358.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J. A., Lareyre, J. J. and Kah, O. (2004). "Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish." General and Comparative Endocrinology **135**(1): 1-16.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mananos, E. L., Gomez, A. and Lareyre, J. J. (2010). "Perspectives on fish gonadotropins and their receptors." General and Comparative Endocrinology **165**(3): 412-437.
- Li, M. D. and Ford, J. J. (1998). "A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the alpha- and beta-subunits of glycoprotein hormone gene family." Journal of Endocrinology **156**(3): 529-542.
- Li, Z. H., Kroll, K. J., Jensen, K. M., Villeneuve, D. L., Ankley, G. T., Brian, J. V., Sepulveda, M. S., Orlando, E. F., Lazorchak, J. M., Kostich, M., Armstrong, B., Denslow, N. D. and Watanabe, K. H. (2011). "A computational model of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in female fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 alpha-ethynylestradiol and 17 beta-trenbolone." Bmc Systems Biology **5**: 22.
- Loir, M. (1999). "Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity." Molecular Reproduction and Development **53**(4): 434-442.
- Loir, M. and Legac, F. (1994). "Insulin-Like Growth Factor-I and Factor-II Binding and Action on DNA-Synthesis in Rainbow-Trout Spermatogonia and Spermatocytes." Biology of Reproduction **51**(6): 1154-1163.
- Marca Pereira, M. L., Wheeler, J. R., Thorpe, K. L. and Burkhardt-Holm, P. (2011). "Development of an ex vivo brown trout (*Salmo trutta fario*) gonad culture for assessing chemical effects on steroidogenesis." Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands) **101**(3-4): 500-11.
- Mason, J. I., Murry, B. A., Olcott, M. and Sheets, J. J. (1985). "Imidazole Antimycotics - Inhibitors of Steroid Aromatase." Biochemical Pharmacology **34**(7): 1087-1092.
- Matta, S. L. P., Vilela, D. A. R., Godinho, H. P. and Franca, L. R. (2002). "The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: The tilapia (*Oreochromis niloticus*) model." Endocrinology **143**(3): 970-978.
- McCurley, A. T. and Callard, G. V. (2008). "Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment." Bmc Molecular Biology **9**: 12.
- Melamed, P., Eliahu, N., Ofir, M., Levavisivan, B., Smal, J., Rentierdelrue, F. and Yaron, Z. (1995). "The Effects of Gonadal Development and Sex Steroids on Growth-Hormone Secretion in the Male Tilapia Hybrid (*Oreochromis-Niloticus* X *Oreochromis-Aureus*)." Fish Physiology and Biochemistry **14**(4): 267-277.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F. and Kah, O. (2005). "Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene." Journal of Comparative Neurology **485**(4): 304-320.
- Miller, W. L. (1988). "Molecular-Biology of Steroid-Hormone Synthesis." Endocrine Reviews **9**(3): 295-318.

- Miranda, C. L., Henderson, M. C. and Buhler, D. R. (1998). Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s. 35th Annual Meeting of the Society-of-Toxicology, Anaheim, California, Academic Press Inc.
- Miura, C., Higashino, T. and Miura, T. (2007). "A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish." Biology of Reproduction **77**(5): 822-828.
- Miura, T. and Miura, C. (2001). "Japanese eel: A model for analysis of spermatogenesis." Zoological Science **18**(8): 1055-1063.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M. R., Todo, T. and Yamauchi, K. (1999). "Estradiol-17 beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males." Biochemical and Biophysical Research Communications **264**(1): 230-234.
- Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K. and Nagahama, Y. (1995). "Human Recombinant Activin Induces Proliferation of Spermatogonia in-Vitro in the Japanese Eel *Anguilla-japonica*." Fisheries Science **61**(3): 434-437.
- Miura, T., Ohta, T., Miura, C. I. and Yamauchi, K. (2003). "Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor." Endocrinology **144**(12): 5504-5510.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. and Nagahama, Y. (1991). "Hormonal Induction of All Stages of Spermatogenesis In vitro in the Male Japanese Eel (*Anguilla-japonica*).". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(13): 5774-5778.
- Moles, G., Gomez, A., Carrillo, M. and Zanuy, S. (2005). "Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males." General and Comparative Endocrinology **176**(1): 70-78.
- Monod, G., Demones, A. and Fostier, A. (1993). "Inhibition of Ovarian Microsomal Aromatase and Follicular Estradiol Secretion by Imidazole Fungicides in Rainbow-Trout." Marine Environmental Research **35**(1-2): 153-157.
- Mortensen, A. S., Tolfen, C. C. and Arukwe, A. (2006). "Gene expression patterns in estrogen (nonylphenol) and aryl hydrocarbon receptor agonists (PCB-77) interaction using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture." Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues **69**(1-2): 1-19.
- Nakamoto, M., Suzuki, A., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2005). "Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*." Biochemical and Biophysical Research Communications **333**(3): 729-736.
- Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. and Tyler, C. R. (2004). "Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish." Environmental Health Perspectives **112**(17): 1725-1733.
- Noaksson, E., Linderöth, M., Bosveld, A. T. C. and Balk, L. (2003). "Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate." General and Comparative Endocrinology **134**(3): 273-284.
- Nobrega, R. H., Batlouni, S. R. and Franca, L. R. (2009). "An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish." Fish Physiology and Biochemistry **35**(1): 197-206.
- Ohisson, A., Cedergreen, N., Oskarsson, A. and Ulleras, E. (2010). "Mixture effects of imidazole fungicides on cortisol and aldosterone secretion in human adrenocortical H295R cells." Toxicology **275**(1-3): 21-28.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K. and Miura, T. (2007). "Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*." Biology of Reproduction **77**(6): 970-977.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. (2007). "Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase." Nature **446**(7135): 562-566.
- Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K. and Kato, S. (2011). "Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals through the ubiquitin system." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **127**(1-2): 102-107.

- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. (2003). "Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor." *Nature* **423**(6939): 545-550.
- OSPAR (2005). "OSPAR Background document on clotrimazole." ISBN: 1-94426-38-7( ).
- Palevitch, O., Abraham, E., Borodovsky, N., Levkowitz, G., Zohar, Y. and Gothliff, Y. (2009). "Nasal Embryonic LHRH Factor Plays a Role in the Developmental Migration and Projection of Gonadotropin-Releasing Hormone 3 Neurons in Zebrafish." *Developmental Dynamics* **238**(1): 66-75.
- Pasmanik, M. and Callard, G. V. (1985). "Aromatase and 5-Alpha-Reductase in the Teleost Brain, Spinal-Cord, and Pituitary-Gland." *General and Comparative Endocrinology* **60**(2): 244-251.
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M. M., Marmignon, M. H., Brion, F., Pakdel, F. and Kah, O. (2007). "Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish." *Journal of Comparative Neurology* **501**(1): 150-167.
- Peschka, M., Roberts, P. H. and Knepper, T. P. (2007). "Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**(3): 959-968.
- Pinto, P. I. S., Teodosio, H. R., Galay-Burgos, M., Power, D. M., Sweeney, G. E. and Canario, A. V. M. (2006). "Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization." *Molecular Reproduction and Development* **73**(3): 318-329.
- Planas, J. V., Swanson, P. and Dickhoff, W. W. (1993). "Regulation of Testicular-Steroid Production in-Vitro by Gonadotropins (Gth-I and Gth-II) and Cyclic-Amp in Coho Salmon (*Oncorhynchus-Kisutch*)." *General and Comparative Endocrinology* **91**(1): 8-24.
- Porsbring, T., Blanck, H., Tjellstrom, H. and Backhaus, T. (2009). "Toxicity of the pharmaceutical clotrimazole to marine microalgal communities." *Aquatic Toxicology* **91**(3): 203-211.
- Querat, B., Arai, Y., Henry, A., Akama, Y., Longhurst, T. J. and Joss, J. M. P. (2004). "Pituitary glycoprotein hormone beta subunits in the Australian lungfish and estimation of the relative evolution rate of these subunits within vertebrates." *Biology of Reproduction* **70**(2): 356-363.
- Remacle, C., Delaere, P. and Jacquet, P. (1976). "Effects of Sex-Hormones and Gonadotropin on Ovary of *Carassius-Auratus* L in Organ-Culture." *General and Comparative Endocrinology* **29**(2): 254-254.
- Roberts, P. H. and Thomas, K. V. (2005). "The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment." *Science of the Total Environment* **356**(1-3): 143-153.
- Rodriguez-Mari, A., Yan, Y. L., BreMiller, R. A., Wilson, C., Canestro, C. and Postlethwait, J. H. (2005). "Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development." *Gene Expression Patterns* **5**(5): 655-667.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R. and McDougal, A. (1998). "Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms." *Toxicology letters* **102-103**: 343-7.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W. A. and van den Berg, M. (2002). "Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* **182**(1): 44-54.
- Schulz, R. W., de Franca, L. R., Lareyre, J. J., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H. and Miura, T. (2010). "Spermatogenesis in fish." *General and Comparative Endocrinology* **165**(3): 390-411.
- Segner, H. (2009). "Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **149**(2): 187-195.
- Segner, H., Navas, J. M., Schaefers, C. and Wenzel, A. (2003). "Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54**(3): 315-322.

- Singh, H., Griffith, R. W., Takahashi, A., Kawauchi, H., Thomas, P. and Stegeman, J. J. (1988). "Regulation of Gonadal Steroidogenesis in Fundulus-Heteroclitus by Recombinant Salmon Growth-Hormone and Purified Salmon Prolactin." General and Comparative Endocrinology **72**(1): 144-153.
- Sipes, N. S., Padilla, S. and Knudsen, T. B. (2011). "Zebrafish-As an Integrative Model for Twenty-first Century Toxicity Testing." Birth Defects Research Part C-Embryo Today-Reviews **93**(3): 256-267.
- Song, M. Y. and Gutzeit, H. O. (2003). "Effect of 17-alpha-ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis." Development Growth & Differentiation **45**(4): 327-337.
- Stamatis, N., Hela, D. and Konstantinou, I. (2010). "Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant." Journal of Hazardous Materials **175**(1-3): 829-835.
- Stan, H. J. and Heberer, T. (1997). "Pharmaceuticals in the aquatic environment." Analisis **25**(7): M20-M23.
- Stocco, D. M. (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." Annual Review of Physiology **63**: 193-213.
- Stocco, D. M. and Clark, B. J. (1996). "Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis." Biochemical Pharmacology **51**(3): 197-205.
- Stromstedt, M., Waterman, M. R., Haugen, T. B., Tasken, K., Parvinen, M. and Rozman, D. (1998). "Elevated expression of lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cells of male rats." Endocrinology **139**(5): 2314-2321.
- Sumpter, J. P. (1998). "Xenoendocrine disrupters - environmental impacts." Toxicology Letters **103**: 337-342.
- Sumpter, J. P. and Jobling, S. (1995). "Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment." Environmental Health Perspectives **103**: 173-178.
- Suzuki, K., Kanamori, A., Nagahama, Y. and Kawauchi, H. (1988). "Development of Salmon Gth-I and Gth-II Radioimmunoassays." General and Comparative Endocrinology **71**(3): 459-467.
- Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H. and Dickhoff, W. W. (1991). "Isolation and Characterization of 2 Coho Salmon Gonadotropins, Gth-I and Gth-II." Biology of Reproduction **44**(1): 29-38.
- Tchoudakova, A. and Callard, G. V. (1998). "Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary." Endocrinology **139**(4): 2179-2189.
- Thomas, K. V. and Hilton, M. J. (2004). "The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries." Marine Pollution Bulletin **49**(5-6): 436-444.
- Timsit, Y. E. and Negishi, M. (2007). "CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors." Steroids **72**(3): 231-246.
- Trosken, E. R., Scholz, K., Lutz, R. W., Volkel, W., Zarn, J. A. and Lutz, W. K. (2004b). "Comparative assessment of the inhibition of human recombinant CYP19 (aromatase) by azoles used as fungicides in agriculture and as antimycotic agents and antitumor drugs in humans." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **369**: R115-R115.
- Trosken, E. R., Straube, E., Lutz, W. K., Volkel, W. and Patten, C. (2004). "Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **15**(8): 1216-1221.
- Trudeau, V. L. (1997). "Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*." Reviews of reproduction **2**(1): 55-68.
- Tseng, H. P., Hseu, T. H., Buhler, D. R., Wang, W. D. and Hu, C. H. (2005). "Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva." Toxicology and Applied Pharmacology **205**(3): 247-258.
- Turgeon, J. L., Kimura, Y., Waring, D. W. and Mellon, P. L. (1996). "Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line." Molecular Endocrinology **10**(4): 439-450.
- Tyler, C. R., Jobling, S. and Sumpter, J. P. (1998). "Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence." Critical Reviews in Toxicology **28**(4): 319-361.

- Tyler, C. R. and Routledge, E. J. (1998). "Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation." *Pure and Applied Chemistry* **70**(9): 1795-1804.
- Tyler, C. R., van Aerle, R., Hutchinson, T. H., Maddix, S. and Trip, H. (1999). "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin." *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(2): 337-347.
- Ueda, H., Kambegawa, A. and Nagahama, Y. (1985). "Involvement of Gonadotropin and Steroid-Hormones in Spermiation in the Amago Salmon, *Oncorhynchus-Rhodurus*, and Goldfish, *Carassius-Auratus*." *General and Comparative Endocrinology* **59**(1): 24-30.
- Van de Steene, J. C., Stove, C. P. and Lambert, W. E. (2010). "A field study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: Removal rates in waste water treatment plants and occurrence in surface water." *Science of the Total Environment* **408**(16): 3448-3453.
- Vandenbossche, H., Marichal, P., Lejeune, L., Coene, M. C., Gorrens, J. and Cools, W. (1993). "Effects of Itraconazole on Cytochrome P-450-Dependent Sterol 14-Alpha-Demethylation and Reduction of 3-Ketosteroids in *Cryptococcus-Neoformans*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**(10): 2101-2105.
- Vidal, V. P. I., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G. and Schedl, A. (2001). "Sox9 induces testis development in XX transgenic mice." *Nature Genetics* **28**(3): 216-217.
- Vilela, D. A. R., Silva, S. G. B., Peixoto, M. T. D., Godinho, H. P. and Franca, L. R. (2003). "Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model." *Fish Physiology and Biochemistry* **28**(1-4): 187-190.
- Villeneuve, D. L., Blake, L. S., Brodin, J. D., Greene, K. J., Knoebl, I., Miracle, A. L., Martinovic, D. and Ankley, G. T. (2007a). "Transcription of key genes regulating gonadal steroidogenesis in control and ketoconazole- or vinclozolin-exposed fathead minnows." *Toxicological Sciences* **98**(2): 395-407.
- Villeneuve, D. L., Larkin, P., Knoebl, I., Miracle, A. L., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Durhan, E. J., Carter, B. J., Denslow, N. D. and Ankley, G. T. (2007d). "A graphical systems model to facilitate hypothesis-driven ecotoxicogenomics research on the teleost brain-pituitary-gonadal axis." *Environmental Science & Technology* **41**(1): 321-330.
- Villeneuve, D. L., Miracle, A. L., Jensen, K. M., Degitz, S. J., Kahl, M. D., Korte, J. J., Greene, K. J., Blake, L. S., Linnam, A. L. and Ankley, G. T. (2007b). "Development of quantitative real-time PCR assays for fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadotropin beta subunit mRNAs to support endocrine disruptor research." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **145**(2): 171-183.
- Vinas, J. and Piferrer, F. (2008). "Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads." *Biology of Reproduction* **79**(4): 738-747.
- Vinggaard, A. M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H. R., Bonefeld-Jorgensen, E., Christiansen, S., Laier, P. and Poulsen, M. E. (2006). "Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action." *International Journal of Andrology* **29**(1): 186-191.
- Vinggaard, A. M., Hnida, C., Breinholt, V. and Larsen, J. C. (2000). "Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro." *Toxicology in Vitro* **14**(3): 227-234.
- Vinggaard, A. M., Nellesmann, C., Dalgaard, M., Jorgensen, E. B. and Andersen, H. R. (2002). "Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz." *Toxicological Sciences* **69**(2): 344-353.
- Vischer, H. F., Granneman, J. C. M., Linskens, M. H. K., Schulz, R. W. and Bogerd, J. (2003). "Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor." *Journal of Molecular Endocrinology* **31**(1): 133-140.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C. and Guiguen, Y. (2007). "Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." *Developmental Dynamics* **236**(8): 2198-2206.
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D. (2000). "Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation." *Critical Reviews in Toxicology* **30**(1): 71-133.
- Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B. C., Combarous, Y., Porcher, J. M., Kah, O. and Brion, F. (2010). "17 alpha-Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the



- expression of brain aromatase during early development of zebrafish." *Aquatic Toxicology* **99**(4): 479-491.
- Wang, X. G. and Orban, L. (2007). "Anti-Mullerian hormone and 11 beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males." *Developmental Dynamics* **236**(5): 1329-1338.
- Wang, Y. J. and Ge, W. (2004). "Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP 17, 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues." *General and Comparative Endocrinology* **135**(2): 241-249.
- Watanabe, K. H., Li, Z., Kroll, K. J., Villeneuve, D. L., Garcia-Reyero, N., Orlando, E. F., Sepulveda, M. S., Collette, T. W., Ekman, D. R., Ankley, G. T. and Denslow, N. D. (2009). "A Computational Model of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Male Fathead Minnows Exposed to 17 alpha-Ethinylestradiol and 17 beta-Estradiol." *Toxicological Sciences* **109**(2): 180-192.
- Who (2002). "ICPS global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors." *International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC/02.2, Geneva, Switzerland.*
- Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T. and Kitano, T. (2007). "Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **359**(4): 935-940.
- Zarn, J. A., Bruschweiler, B. J. and Schlatter, J. R. (2003). "Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase." *Environmental Health Perspectives* **111**(3): 255-261.
- Zhang, W. L., Zhou, L. Y., Senthikumar, B., Huang, B. F., Sudhakumari, C. C., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Wang, D. S. (2010). "Molecular cloning of two isoforms of 11 beta-hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." *General and Comparative Endocrinology* **165**(1): 34-41.
- Zhang, X. W., Hecker, M., Jones, P. D., Newsted, J., Au, D., Kong, R., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2008a). "Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole." *Environmental Science & Technology* **42**(17): 6762-6769.
- Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G. and Chen, S. (2001). "Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes." *General and Comparative Endocrinology* **123**(2): 180-191.
- Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R. M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J. R., Small, C. and Griswold, M. D. (2008). "Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro." *Biology of Reproduction* **78**(3): 537-545.
- Zohar, Y., Munoz-Cueto, J. A., Elizur, A. and Kah, O. (2010). "Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish." *General and Comparative Endocrinology* **165**(3): 438-455.